

ХАРАКТЕРИСТИКА АЛЛЕЛОФОНДА РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ ОВЕЦ ПО ГЕНУ ПРИОНОВОГО БЕЛКА, АССОЦИИРОВАННОГО С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К СКРЕПИ*

Е.А. ГЛАДЫРЬ¹, Т.Е. ДЕНИСКОВА¹, В.А. БАГИРОВ¹, О.В. КОСТЮНИНА¹,
Н.Н. МАКАРОВА², Г. БРЕМ^{1, 3}, Н.А. ЗИНОВЬЕВА¹

Романовская порода — уникальная аборигенная порода, разводящаяся в России и относящаяся к группе северных короткохвостых овец. Она известна во всем мире благодаря полиэстичности, феноменальной плодовитости (до 10 ягнят) и непревзойденному качеству овчин. Генофонд породы активно используется для создания новых типов современных многоплодных овец и рассматривается как важный генетический резерв для овцеводства будущего. Устойчивость к заболеваниям — важнейший селекционный признак овец. Губчатая энцефалопатия овец, известная также под названием скрепи, способна нанести серьезный экономический ущерб овцеводству. Это фатальное нейродегенеративное заболевание овец и коз, относящееся наряду с губчатой энцефалопатией крупного рогатого скота (BSE) к классу трансмиссивных губчатых энцефалопатий (TSE). С резистентностью или чувствительностью овец к классической скрепи ассоциировано три полиморфизма в аминокислотных кодонах 136 (A/V), 154 (R/H) и 171 (R/Q/H) гена прионового белка *PRNP*. В зависимости от генотипа по *PRNP* различают пять классов генетической устойчивости к скрепи (G1-G5). Желательным с точки зрения устойчивости считается гаплотип ARR. Вместе с тем открытие атипичной скрепи (Nor98) показало возможность передачи BSE животным различных классов устойчивости, включая G1 (генотип ARR/ARR). Показана роль аминокислотной замены L/F в позиции 141 в обеспечении устойчивости к атипичной скрепи. Целью настоящей работы было исследование аллелофонда овец романовской породы (*Ovis aries*) по гену *PRNP*, ассоциированному с устойчивостью как к классической, так и атипичной формам скрепи. Материалом для исследований служили пробы ткани 364 клинически здоровых животных романовской породы, представляющих три современные популяции Ярославской области и одну популяцию, интродуцированную для разведения в Камчатский край. Геномную ДНК выделяли с использованием колонок фирмы Nexttec («Nexttec Biotechnologie GmbH», Германия). Идентификацию аллелей в кодонах 136 (A/T/V), 141 (L/F), 154 (R/H) и 171 (Q/R/H/K) выполняли посредством пиросеквенирования на приборе PSQ96MA («Quiagen», США). Показано наличие в романовской породе четырех гаплотипов 136/154/171 (ARR, ARQ, AHQ и VRQ) и девяти генотипов *PRNP* (ARR/ARR, ARR/ARQ, ARR/AHQ, ARQ/ARQ, AHQ/ARQ, AHQ/AHQ, ARR/VRQ, VRQ/AHQ и ARQ/VRQ), относящихся ко всем пяти классам генетической устойчивости к классической скрепи. Наиболее распространенным оказался гаплотип «дикого» типа ARQ (от 0,704 до 0,933) и генотип ARQ/ARQ (класс устойчивости G3). Во всех группах выявлен желательный гаплотип ARR, частота которого варьировала от 0,022 до 0,089 и в среднем составляла 0,066. Нежелательный гаплотип VRQ встречался в трех из четырех исследованных групп, при этом его частота была относительно низкой — от 0,011 до 0,022. Исследование полиморфизма *PRNP* по четырем кодонам 136/141/154/171 выявило наличие 5 гаплотипов — ALRR, ALRQ, ALHQ, VLRQ, AFRQ и 10 генотипов. Обнаружено одно животное, несущее «чувствительный» к атипичной скрепи аллель F в позиции 141 *PRNP* (генотип VLRQ/AFRQ), что соответствует частоте встречаемости аллеля 0,001. Полученные данные найдут применение при разработке программ селекции романовской породы овец, а также при стратегическом планировании мероприятий по сохранению популяционно-генетического разнообразия этой уникальной российской северной короткохвостой овцы.

Ключевые слова: ген прионового протеина (*PRNP*), аллелофонд, романовская порода овец, генетическая устойчивость, скрепи.

Сохранение уникального генофонда автохтонных пород России при их гармоничной интеграции в селекционный процесс с учетом мировых трендов в животноводстве — актуальная задача современной биологической науки (1-3). Животноводческая продукция, получаемая от таких пород, представляет интерес для нутрициологии и перерабатывающей промышленности. Романовская порода — уникальная российская аутен-

* Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-36-00039) и Федерального агентства научных организаций (тема № 0600-2014-0004.3). В проведении исследований использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» (ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста).

тичная порода, представляющая одно из отродий северных короткохвостых овец (4, 5). Самобытность романовской породы обусловлена сочетанием непревзойденных качеств шубных овчин с феноменальной (до 10 ягнят) плодовитостью и полиэстричностью (6). История создания породы берет начало в XVII веке, впервые она упоминается в 1802 году (6). Сто лет назад грубошерстное овцеводство, сохраняемое в полунатуральных крестьянских хозяйствах, не только удовлетворяло потребности крестьян в шерсти и мясе, но и давало продукцию на экспорт (7). Признанный классик зоотехнической науки П.Н. Кулешов, обеспокоенный сокращением поголовья овец в России в начале прошлого века, предлагал наметить овцеводческие районы, среди которых на первое место ставил «овчинный район короткохвостой овцы с романовской в центре» (5). В настоящее время генофонд романовских овец рассматривается как важный резерв для создания новых стад, линий, типов многоплодных овец разного направления продуктивности.

Губчатая энцефалопатия овец, известная также под названием скрепи, — одно из заболеваний, способных нанести серьезный экономический ущерб овцеводству. Скрепи — фатальное нейродегенеративное заболевание, поражающее овец и коз, и относящееся к классу трансмиссивных губчатых энцефалопатий (transmissible spongiform encephalopathy, TSE). В эту группу входит также губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (bovine spongiform encephalopathy, BSE). Причиной TSE становится наличие инфекционных патогенов — прионов, которые не имеют нуклеиновых кислот и, по всей видимости, состоят исключительно из модифицированного белка (PrP^{Sc}). Нормальный клеточный PrP (PrP^{C}) конвертируется в PrP^{Sc} посредством посттрансляционного процесса, результатом которого становится высокое содержание β -листов (8). Установлено, что устойчивость к скрепи у овец обусловлена главным образом полиморфизмом гена прионового белка (*PRNP*), кодирующего нормальный PrP^C. С резистентностью или чувствительностью овец к классической скрепи ассоциированы три мутации в аминокислотных кодонах 136 (A/V), 154 (R/H) и 171 (R/Q/H) (9-13).

Основные пары аминокислот (AK), кодирующих три знаковых кодона 136/154/171, определяют формирование 15 возможных генотипов *PRNP* (14, 15). Желательным с точки зрения устойчивости к скрепи считается гаплотип $\text{A}^{136}\text{R}^{154}\text{R}^{171}$, обозначаемый ARR. В зависимости от генотипа по *PRNP* различают пять классов генетической устойчивости к скрепи, получивших название по мере снижения устойчивости от G1 до G5. К классу G1 относится наиболее предпочтительный генотип ARR/ARR. Среди десятков тысяч генотипированных овец класса G1 за последние 25 лет не было диагностировано ни одного случая заболевания классической скрепи (16, 17). Однако успешная передача BSE прионов овцам с генотипом ARR/ARR посредством внутримозговой инокуляции показала, что устойчивость этого генотипа к TSE агентам не абсолютная (18). Следует также указать на два диагностированных в Германии случая заболевания овец с генотипом ARR/ARR энцефалопатией, которая по характеристикам подобна классической форме скрепи (15).

Животные с генотипами ARR/AHQ, ARR/ARH, ARR/ARQ генетически устойчивы к скрепи. В целях исключения чувствительности к этому заболеванию у потомства они могут использоваться в селекции только при контроле подборов (G2). Особи с генотипами ARQ/ARQ (дикий тип), ARQ/ARH, ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH и AHQ/ARH (класс G3) обладают низкой генетической устойчивостью, однако при спаривании с

животными G1 дают устойчивое потомство. Носители генотипов ARR/VRQ (G4) и VRQ/AHQ, VRQ/ARH, VRQ/ARQ, VRQ/VRQ (G5) чувствительны к скрепи и должны исключаться из воспроизводства. Показано, что на устойчивость к прионовому протеину и BSE могут влиять иные аминокислотные полиморфизмы, в частности в позициях 101, 112, 143, 172, 175 и 176, большинство из которых встречаются с низкой (< 5 %) частотой (19). Описан октопептидный полиморфизм, проявляющийся в разном числе повторов восьми аминокислот P(Q/H)GGGWGQ, расположенных на N-терминальном конце. Число повторов у крупного рогатого скота, овец и коз варьирует как между, так и внутри видов, изменяясь от двух до пяти (20, 21). Выявлены полиморфизмы *PRNP* в трех позициях в промоторной области (C5354A, T5382C и C5622G), при этом два последних полиморфизма могут оказывать существенное влияние на свойства факторов транскрипции (22, 23).

Открытие так называемой атипичной скрепи показало возможность передачи BSE животным различных классов устойчивости, включая G1 (генотип ARR/ARR). Впервые атипичная скрепи была обнаружена у норвежских овец в 2003 году и получила название Nor98 (24). В дальнейшем высокую заболеваемость атипичной скрепи установили в Германии и Франции (25). В Великобритании на атипичные случаи в 2005 году приходилось 37 % от общего числа овец, заболевших скрепи (26). Атипичная и классическая скрепи различаются по ряду важных признаков. Заболевание атипичной формой происходит в более позднем возрасте (4 года и старше), часто в инфицированном стаде обнаруживаются только отдельные заболевшие особи (27). В отличие от патологии классической скрепи, при атипичной форме лишь в редких случаях или вообще не наблюдается нейрональная вакуолизация или наличие иммуногистохимически детектируемого PrP^{Sc} в мозге (24). Аномальный PrP в атипичных случаях характеризуется большей чувствительностью к энзиматическому расщеплению по сравнению с классической формой (28). Исследования показали, что при заболевании атипичной формой Nor98 возрастает роль четвертой аминокислоты в знаковых АК кодонах 136/141/154/172 в позиции 141 (L/F). Большинство случаев атипичной скрепи были выявлено среди животных с низкой чувствительностью к классической скрепи (классы G1-G3) (28-30).

С обнаружением стойкой генетической резистентности у овец определенных генотипов по *PRNP* к классической скрепи и с выявлением природы атипичной скрепи (24) появилась возможность использовать полиморфизм *PRNP* в качестве дополнительного критерия в селекционных программах, достигая баланса между генетическим разнообразием популяций и возможностью превентивных мер в борьбе со скрепи.

Изучение овец романовской породы на ограниченной выборке показало невысокую генетическую устойчивость к классической скрепи (31). Однако исследованные стада имели в основном вторичное происхождение и были сформированы посредством завоза лимитированного числа линий. Следовательно, полученные данные не позволяют судить об аллелофонде породы. Исследования на устойчивость романовских овец к атипичной скрепи до настоящего времени не проводились.

Животные из генофондных стад Ярославской области могут быть наиболее яркой моделью, отражающей все генетическое разнообразие аллелофонда романовской породы. Для проверки гипотезы о том, что аллелофонд вторично натурализованных стад этой породы, сформированных посредством завоза ограниченного числа линий и находящихся под давлением иных факторов отбора, нетипичен для породы в целом, актуально

включение таких животных в исследование.

Нами впервые проанализирован генетический полиморфизм популяций романовских овец (*Ovis aries*) в АК позиции 141 гена *PRNP* и определена их восприимчивость к атипичному прионовому белку Noг98.

Целью работы было изучение аллелофонда овец романовской породы по гену прионового протеина, ассоциированного с устойчивостью к классической и атипичной формам скрепи, на исторических территориях формирования породы и в местах ее вторичной натурализации.

Методика. Биоматериалом служили пробы ткани (ушной выщип, кровь) от 364 предварительно здоровых овец романовской породы, архивированные в 2013–2016 годах. Были изучены три популяции из Ярославской области, содержащиеся в ООО «Авангард» (Pop_1, $n = 168$), ООО «Агрофима Земледелец» (Pop_2, $n = 98$) и ООО «Заречье» (Pop_3, $n = 46$), и одна популяция, интродуцированная для разведения на территории Камчатского края в ОАО «Камчатагроплемсервис» (Pop_4, $n = 52$).

ДНК выделяли с использованием колонок Nexttec («Nexttec GmbH», Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Постановку ПЦР осуществляли по методике Н.А. Зиновьевой с соавт. (32). Реакции проводили согласно протоколу, изложенному Е.А. Гладырь с соавт. (33). Идентификацию аллелей в кодонах 136 (A/T/V), 141 (L/F), 154 (R/H) и 171 (Q/R/H/K) выполняли пиросеквенированием на приборе PSQ96MA («Qiagen», США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ PSQ96MA SNP Software v.2.0, Microsoft Excel, GenAlEx 6.501.

Результаты. Исследования показали наличие в романовской породе четырех гаплотипов (ARR, ARQ, AHQ, VRQ) и девяти генотипов *PRNP* (ARR/ARR, ARR/ARQ, ARR/AHQ, ARQ/ARQ, AHQ/ARQ, AHQ/AHQ, ARR/VRQ, VRQ/AHQ, ARQ/VRQ), относящихся ко всем пяти классам генетической устойчивости к классической скрепи. При этом наблюдались различия в распределении гаплотипов и генотипов между группами. Наиболее распространенным оказался гаплотип дикого типа ARQ, кото-



Распределение гаплотипов *PRNP* ARR (а), ARQ (б), AHQ (в), VRQ (г), ассоциированных с устойчивостью к классической форме скрепи, в популяциях овец романовской породы: Pop_1 — ООО «Авангард», Pop_2 — ООО «Агрофима Земледелец», Pop_3 — ООО «Заречье» (Ярославская обл.); Pop_4 — ОАО «Камчатагроплемсервис» (Камчатский край).

при этом его частота была относительно низкой — от 0,011 (Pop_2) до 0,022 (Pop_3) (рис.).

Наиболее часто во всех популяциях, как и прогнозировалось, встречался генотип дикого типа ARQ/ARQ, относящийся к классу устойчивости G3 (табл.). Вероятно, это обусловлено длительным разведением породы «в себе», направленным исключительно на закрепление ее уникальных адаптационных и продуктивных качеств. Отмечалась очень низкая частота генотипа ARR/ARR, наиболее устойчивого к классической

рый встречался с частотой от 0,704 в Pop_1 до 0,933 в Pop_4. Во всех группах был выявлен желательный гаплотип ARR, частота которого варьировала от 0,022 в Pop_3 до 0,089 в Pop_1 и в среднем составляла 0,066. Нежелательный гаплотип VRQ встречался в трех из четырех групп (исключение — Pop_1),

форме скрепи. Доля животных, несущих генотипы класса G2, различалась между стадами даже в пределах одного региона более чем в 8 раз. По всей видимости, это было связано с преимущественным использованием баранов-производителей разных линий.

В целом исследованная выборка романовских овец характеризовалась относительно невысокими частотами генотипов, относящихся к генетическим классам G4 и G5 и обуславливающих высокий риск заболевания классической скрепи. Такие генотипы были выявлены в трех из четырех популяций с частотой от 2,2 до 4,1 %.

Распределение генотипов по гену прионового белка *PRNP* (Г) и классов (К) устойчивости к классической форме скрепи в популяциях овец романовской породы

Генотип 136/154/171	Частота									
	Pop_1		Pop_2		Pop_3		Pop_4		В среднем	
	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К
ARR/ARR	-	-	0,010	0,010	-	-	-	-	0,003	0,003
ARR/ARQ	0,143	} 0,208	0,061	} 0,061	0,022	} 0,022	0,058	} 0,058	0,093	} 0,123
ARR/ANQ	0,066		-		0,022		-		-	
ARQ/ARQ	0,446	} 0,792	0,592	} 0,888	0,609	} 0,934	0,865	} 0,904	0,566	} 0,852
ANQ/ARQ	0,316		0,265		0,282		0,039		0,258	
ANQ/ANQ	0,030		0,031		0,043		-		0,028	
ARR/VRQ	-	-	-	-	0,022	-	-	-	0,003	0,003
VRQ/ANQ	-	} -	0,031	} 0,041	-	} 0,022	-	} 0,038	0,008	} 0,019
VRQ/ARQ	-		0,010		0,022		0,038		0,011	

Примечание. Описание популяций см. в разделе «Методика». Прочерки означают отсутствие соответствующего генотипа в исследуемых популяциях.

Мы впервые оценили генетический статус романовской породы по предрасположенности к инфицированию атипичным прионовым белком Nor98. В результате выявили совокупно пять различных гаплотипов — ALRR, ALRQ, ALHQ, VLRQ и AFRQ, а также десять генотипов *PRNP* (136/141/154/171) — ALRR/ALRR, ALRR/ALRQ, ALRR/ALHQ, ALRQ/ALRQ, ALHQ/ALRQ, ALHQ/ALHQ, ALRR/VLRQ, VLRQ/ALHQ, VLRQ /ALRQ и VLRQ /AFRQ. В большинстве своем частота встречаемости гаплотипов и генотипов по четырем кодонам повторяла профили, полученные для кодонов 136/154/171. Только в Pop_4 обнаружили одно животное, несущее в позиции 141 *PRNP* аллель F, ассоциированный с чувствительностью к атипичной скрепи (генотип VLRQ/AFRQ), что соответствовало частоте встречаемости аллеля 0,001. Важно отметить, что аллель F¹⁴¹ был идентифицирован в сочетании с гаплотипом VRQ, максимально восприимчивым к классической скрепи, в составе генотипа VRQ/ARQ (генетический класс G5).

Как известно, восприимчивость овец к классической скрепи напрямую зависит от определенных несинонимических единичных нуклеотидных полиморфизмов в пределах гена прионового протеина *PRNP*, локализованного на 13-й хромосоме (34-36). Современные молекулярно-генетические технологии позволяют исследовать генотип животного в первые дни жизни и осуществлять ранний контроль над распространением наследственных дефектов. Также выполняются работы по сохранению, использованию и развитию генофондов локальных пород для эффективной интеграции в современное животноводство с целью получения возможных новых селекционных форм и повышения численности животных нативных пород. Цель большинства программ разведения овец — контроль за состоянием генофонда породы посредством постепенного замещения генотипов, характеризующихся повышенной восприимчивостью к

скрепи, с использованием баранов с ARR/ARR генотипами. Аккумуляция в породах и отдельных популяциях гаплотипа ARR необходима для обеспечения превентивной защиты от классического патогенного приона, вызывающего скрепи. Этот факт подтверждают исследования, проведенные в Канаде в 2008–2012 годах на 184 овцах романовской породы, показавшие пластичность ее генофонда и позволившие с помощью селекции довести частоту встречаемости гаплотипа ARR и генотипа ARR/ARR соответственно до 0,592 и 0,359 (37). Вместе с тем высокая частота гаплотипа дикого типа в аборигенных и культурных породах, отмеченная в ряде исследований (38, 39), остается актуальной проблемой при селекционной работе.

Таким образом, наши данные позволили оценить аллелофонд овец романовской породы, разводимых на исторических территориях возникновения и в местах интродукции, на генетическую устойчивость к классической и атипичной формами скрепи. Средняя частота встречаемости нежелательного V¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹ гаплотипа и аллеля F¹⁴¹, ассоциированного с чувствительностью к атипичной скрепи, составляла соответственно 0,011 и 0,001, что имеет положительное значение для дальнейшего совершенствования и сохранения романовской овцы. В изученных популяциях выявлен явный дефицит животных с генотипом, относящимся к генетическому классу G1, а частота встречаемости устойчивого к классической скрепи гаплотипа ARR составляла в среднем 0,066. Это создает предпосылки для выполнения стратегических селекционных программ по накоплению устойчивых к патогенному приону генотипов в генофондных стадах романовской породы. Чтобы предотвратить развитие классической и атипичной форм скрепи в российских популяциях, нужно вести селекцию на генетическую резистентность к скрепи, повышая число животных — носителей аллеля ARR и генотипа ARR/ARR. Для эффективной селекционной работы и сохранения популяционно-генетического разнообразия этой уникальной российской северной овцы необходимо исследовать аллелофонд всего племенного поголовья романовской породы.

¹ФГБНУ Федеральный научный центр
животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: elenagladyr@mail.ru, tandeniss@rambler.ru, vugarbagirov@mail.ru,
kostolan@yandex.ru, n_zinovieva@mail.ru;

Поступила в редакцию
4 октября 2017 года

²ООО «Агриволга»,
152615 Россия, Ярославская обл., г. Углич, ул. Спасская, 11,
e-mail: N.Makarova@agrivolga.ru;

³Institut für Tierzucht und Genetik,
University of Veterinary Medicine (VMU),
Veterinärplatz, A-1210, Vienna, Austria,
e-mail: gottfried.brem@vetmeduni.ac.at

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2017, V. 52, № 6, pp. 1157–1165

CHARACTERISTICS OF ALLELE POOL OF THE ROMANOV SHEEP BREED FOR THE PRION PROTEIN GENE ASSOCIATED WITH GENETIC SUSTAINABILITY TO SCRAPIE

*E.A. Gladyr¹, T.E. Deniskova¹, V.A. Bagirov¹, O.V. Kostyunina¹, N.N. Makarova²,
G. Brem^{1, 3}, N.A. Zinovieva¹*

¹L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Federal Agency of Scientific Organizations, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail elenagladyr@mail.ru (corresponding author), tandeniss@rambler.ru, vugarbagirov@mail.ru, kostolan@yandex.ru, n_zinovieva@mail.ru (corresponding author);

²LLC «Agrivolga», 11, ul. Spasskaya, Uglich, Yaroslavl Province, 152615 Russia, e-mail N.Makarova@agrivolga.ru;

³Institut für Tierzucht und Genetik, University of Veterinary Medicine (VMU), Veterinärplatz, A-1210, Vienna, Austria, e-mail gottfried.brem@vetmeduni.ac.at

ORCID:

Gladyr E.A. orcid.org/0000-0002-5210-8932
Bagirov V.A. orcid.org/0000-0001-8385-2433
Makarova N.N. orcid.org/0000-0002-4742-9985
Zinovieva N.A. orcid.org/0000-0003-4017-6863

Deniskova T.E. orcid.org/0000-0002-5809-1262
Kostyunina O.V. orcid.org/0000 0001 8206 3221
Brem G. orcid.org/0000-0002-7522-0708

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The equipment of the Center for Bioresources and Bioengineering of Agricultural Animals was used in the study. Supported financially by Russian Science Foundation, project № 14-36-00039, and Federal Agency of Scientific Organizations, theme № 0600-2014-0004.3

Received October 4, 2017

doi: 10.15389/agrobiol.2017.6.1157eng

Abstract

The Romanov is a unique indigenous sheep breed of Russia, belonging to the group of Northern short-tailed sheep. The breed is known all over the world, due to out-of-season breeding ability, phenomenal fecundity (up to 10 lambs) and unsurpassed quality of sheepskins. Presently the gene pool of the breed is actively involved in creation of new types of modern prolific sheep and it is considered as an important genetic reserve for the sheep breeding of the future. Diseases resistance is the most important selection trait in sheep. One of the diseases which can cause serious economic losses is spongiform encephalopathy of sheep, also known as scrapie. Scrapie is a fatal neurodegenerative disease of sheep and goats, belonging to the class of transmissible spongiform encephalopathies (TSE), which also includes bovine spongiform encephalopathy (BSE). Three polymorphisms in amino acid codons 136 (A/V), 154 (R/H), and 171 (R/Q/H) of the *PRNP* gene are associated with resistance or susceptibility of sheep to classical scrapie. Depending on the *PRNP* genotype, there are five classes of genetic sustainability to Scrapie (G1-G5). The ARR allele is desirable regarding the resistance to scrapie. However, discovery of atypical scrapie (Nor98) showed a possibility of transmitting BSE to animals of different sustainability classes, including G1 (ARR/ARR genotype). It is shown, that L/F amino acid substitution at position 141 provides resistance to atypical scrapie. The aim of our work was to study the allele pool of the Romanov sheep by the *PRNP* gene, associated with sustainability to both classical and atypical forms of scrapie. The material for the work was tissue samples of 364 clinically healthy Romanov animals including three modern populations of the Yaroslavl region and one population introduced for breeding in the Kamchatka. Genomic DNA was isolated using the Nexttec columns (Nexttec Biotechnologie GmbH, Germany). Identification of the alleles in the codons 136 (A/T/V), 141 (L/F), 154 (R/H) and 171 (Q/R/H/K) was performed by pyrosequencing on the PSQ96MA device (Quiagen, USA). We found four alleles, 136/154/171 — ARR, ARQ, AHQ and VRQ, and nine haplotypes of PRNP as ARR/ARR, ARR/ARQ, ARR/AHQ, ARQ/ARQ, AHQ/ARQ, AHQ/AHQ, ARR/VRQ, VRQ/AHQ and ARQ/VRQ, relating to all five classes of genetic sustainability to the classical Scrapie. The allele of wild type ARQ (the frequency from 0.704 to 0.933) and the genotype ARQ/ARQ (sustainability class G3) were the prevalent. In all the studied groups, a desirable ARR allele was identified with frequencies varied from 0.022 to 0.089 and averaged 0.066. The undesirable VRQ allele was found in three of the four groups, while its frequency was relatively low — from 0.011 to 0.022. The study of the *PRNP* polymorphism by four codons 136/141/154/171 revealed the presence of five different alleles — ALRR, ALRQ, ALHQ, VLRQ, AFRQ and ten genotypes. We detected an animal carrying a sensitive to the atypical scrapie allele F at position 141 of *PRNP* (genotype VLRQ/AFRQ) with the allele frequency of 0.001. The results will be applied in the development of breeding programs for Romanovs, as well as in strategic planning of conservation of the genetic diversity of this unique Russian Northern short-tailed sheep.

Keywords: prion protein gene (*PRNP*), allele pool, the Romanov sheep, genetic sustainability, scrapie.

REFERENCES

1. Ernst L.K., Zinov'eva N.A. *Biologicheskie problemy zhivotnovodstva v XXI veke* [Challenges in biology of XXI century]. Moscow, 2008 (in Russ.).
2. Stolpovskii Yu.A. Concept and principles of genetic monitoring for the purpose of preservation in situ of domestic animals kinds. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* [Agricultural Biology], 2010, 6: 3-8 (in Russ.).
3. Deniskova T.E., Selionova M.I., Gladyr' E.A., Dotsev A.V., Bobryshova G.T., Kostyunina O.V., Brem G., Zinovieva N.A. Variability of microsatellites in sheep breeds raced in Russia. *Agricultural Biology*, 2016, 51(6): 801-810 (doi: 10.15389/agrobiol.2016.6.801eng) (in Engl.).
4. Ivanov M.F. *Ovtsevodstvo* [Sheep farming]. Moscow, 1933 (in Russ.).
5. Kuleshov P.N. *Ovtsevodstvo Rossii* [Sheep breeding in Russia]. Petrograd, 1916 (in Russ.).
6. Ernst L.K., Dmitriev N.G., Paronyan I.A. *Geneticheskie resursy sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh v Rossii i sopedel'nykh stranakh* [Gene pool of farm animals in Russia and

- neighboring countries]. St. Petersburg, 1994 (in Russ.).
7. Dankvert A.G., Dankvert S.A. *Istoriya plemennogo zivotnovodstva Rossii* [History of pedigree animal breeding in Russia]. Moscow, 2004 (in Russ.).
 8. Prusiner S.B. Prions. *PNAS*, 1998, 95(23): 13363-13383.
 9. Hunter N., Goldmann W., Foster J. D., Cairns D., Smith G. Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. *Vet. Rec.*, 1997, 141: 137-140 (doi: 10.1136/vr.141.6.137).
 10. Smits M.A., Barillet F., Harders F., Boscher M.Y., Vellema P., Aguerre X., Hellinga M., McLean A.R., Baylis M., Elsen J.M. Genetics of scrapie susceptibility and selection for resistance. *Proc. 51st Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. The Hague, Netherlands, 2000: Paper S.4.4.
 11. Bossers A., Belt P.B.G.M., Raymond G.J., Caughey B., de Vries R., Smits M.A. Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *PNAS*, 1997, 94(10): 4931-4936 (doi: 10.1073/pnas.94.10.4931).
 12. Ishiguro N., Shinagawa M., Onoe S., Yamanouchi K., Saito T. Rapid analysis of allelic variants of the sheep PrP gene by oligonucleotide probes. *Microbiol. Immunol.*, 1998, 42: 579-582 (doi: 10.1111/j.1348-0421.1998.tb02327.x).
 13. Buschmann A., Biacabe A.G., Ziegler U., Bencsik A., Madec J.Y., Erhardt G. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Methods*, 2004, 117: 27-36 (doi: 10.1016/j.jviromet.2003.11.017).
 14. DEFRA. *National scrapie plan for great britain*. London, 2001: 1-28.
 15. Groschup M.H., Lacroux C., Buschmann F., Luhken G., Mathey J., Eiden M., Lugan S., Hoffmann C., Espinosa J.C., Baron T., Torres J.M., Erhardt G., Andreoletti O. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, 13(8): 1201-1207 (doi: 10.3201/eid1308.070077).
 16. Renaville R. *Résistance génétique a la «Tremblante» (aussi appelée scrapie) chez le mouton*. FIOW Gembloux, Belgique, 2002.
 17. Vaccari G., Di Bari M.A., Morelli L., Nonno R. Chiappini B., Antonucci G., Marcon S., Esposito E., Fazzi P., Palazzini N., Troiano P., Petrella A., Guardo G.-D., Agrimi U. Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. *J. Gen. Virol.*, 2006, 87: 1395-1402 (doi: 10.1099/vir.0.81485-0).
 18. Houston F., Goldmann W., Chong A., Jeffrey M., Gonzalez L., Foster J. Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature*, 2003, 423: 498 (doi: 10.1038/423498a).
 19. Acín C., Martín-Burriel I., Goldmann W., Lyahyai J., Monzón M., Bolea R., Smith A., Rodellar C., Badiola J.J., Zaragoza P. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J. Gen. Virol.*, 2004, 85: 2103-2110 (doi: 10.1099/vir.0.80047-0).
 20. Goldmann W., Chong A., Foster J., Hope J., Hunter N. The shortest known prion protein gene allele occurs in goats, has only three octapeptide repeats and is non-pathogenic. *J. Gen. Virol.*, 1998, 79(12): 3173-3176 (doi: 10.1099/0022-1317-79-12-3173).
 21. Schläpfer J., Saitbekova N., Gaillard C., Dolf G. A new allelic variant in the bovine prion protein gene (*PRNP*) coding region. *Anim. Genet.*, 1999, 30(5): 386-387 (doi: 10.1046/j.1365-2052.1999.00526-5.x).
 22. O'Neill G.T., Donnelly K., Marshall E., Cairns D., Goldmann W., Hunter N. Characterization of ovine PrP gene promoter activity in N2a neuroblastoma and ovine foetal brain cell lines. *J. Anim. Breed. Genet.*, 2003, 120(2): 114-123 (doi: 10.1046/j.1439-0388.2003.00381.x).
 23. O'Neill G.T., Cairns D., Toovey L., Goldmann W., Hunter N. New ovine PrP gene haplotypes as a result of single nucleotide polymorphisms in the PrP gene promoter. *J. Anim. Breed. Genet.*, 2005, 122(2): 86-94 (doi: 10.1111/j.1439-0388.2005.00520.x).
 24. Benestad S.L., Sarradin P., Thu B., Schönheit J., Tranulis M.A., Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.*, 2003, 153: 202-208 (doi: 10.1136/vr.153.7.202).
 25. Buschmann A., Biacabe A.G., Ziegler U., Bencsik A., Madec J.Y., Erhardt G., Luhken G., Baron T., Groschup M.H. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Methods*, 2004, 117: 27-36 (doi: 10.1016/j.jviromet.2003.11.017).
 26. Everest S.J., Thorne L., Barnicle D.A., Edwards J.C., Elliott H., Jackman R., Hope J. Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme. *J. Gen. Virol.*, 2006, 87(2): 471-477 (doi: 10.1099/vir.0.81539-0).
 27. Luhken G., Buschmann A., Brandt H., Eiden M., Groschup M.H., Erhardt G. Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet. Res.*, 2007, 38: 65-80 (doi: 10.1051/vetres:2006046).
 28. Le Dur A., Béringue V., Andréoletti O., Reine F., Lan Lai T., Baron T., Bratberg B., Vilotte J.-L., Sarradin P., Benestad S.L., Laude H. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *PNAS*,

- 2005, 102(44): 16031-16036 (doi: 10.1073/pnas.0502296102).
29. Langeveld J.P.M., Jacobs J.G., Hunter N., van Keulen L.J.M., Lantier F., van Zijderveld F.G., Bossers A. Prion type-dependent deposition of *PRNP* allelic products in heterozygous sheep. *J. Virol.*, 2016, 90(2): 805-812 (doi: 10.1128/JVI.02316-15).
 30. Gonzalez L., Jeffrey M., Dagleish M.P., Goldmann W., Siso S., Eaton S.L., Martin S., Finlayson J., Stewart P., Steele P., Pang Y., Hamilton S., Reid H.W., Chianini F. Susceptibility to scrapie and disease phenotype in sheep: cross-*PRNP* genotype experimental transmissions with natural sources. *Vet. Res.*, 2012, 43: 55 (doi: 10.1186/1297-9716-43-55).
 31. Gladyr' E.A., Zinov'eva N.A., Burylova S.S., Selionova M.I., Moiseikina L.G., Ernst L.K., Brem G. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2012, 11: 34-37 (in Russ.).
 32. Zinov'eva N.A., Popov A.N., Ernst L.K., Marzanov N.S., Bochkarev V.V., Strekozov N.I., Brem G. *Metodicheskie rekomendatsii po ispol'zovaniyu metoda polimeraznoi tsepnoi reaktsii v zhivotnovodstve* [PCR in livestock farming. Manual guid]. Dubrovitsy, 1998 (in Russ.).
 33. Gladyr' E.A., Zinov'eva N.A., Brem G. *Sposob genodiagnostiki ustoichivosti ovets k skrepi. A.S. 2303067 (RF) MPK C12N 15/00, C12N 15/12. FGBNU FNTS VIZH im. L.K. Ernsta (Vserossiiskii gosudarstvennyi nauchno-issledovatel'skii institut zhivotnovodstva (VIZH) (RF). № 2005128754/13. Zayavl. 16.05.2005. Opubl. 20.07.2007. Byul. № 20* [Gene typing of sheep resistance to scrapie. Patent RF № 2005128754/13. Appl. 16.05.2005. Publ. 20.07.2007. Bul. № 20] (in Russ.).
 34. Belt P.B.G.M., Muileman I.H., Schreuder B.E.C., Bos-de Ruijter J., Gielkens A.L., Smits M.A. Identification of five allelic variants of the sheep *PrP* gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, 1995, 76: 509-517 (doi: 10.1099/0022-1317-76-3-509).
 35. Goldmann W., Hunte N., Benson G., Foster J.D., Hope J. Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the *Sip* gene. *J. Gen. Virol.*, 1991, 72: 2411-2417 (doi: 10.1099/0022-1317-72-10-2411).
 36. Hunter N., Goldmann W., Smith G., Hope J. The association of a codon 136 *PrP* gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch. Virol.*, 1994, 137: 171-177 (doi: 10.1007/BF01311184).
 37. Cameron S., Bell-Rogers P., McDowall R., Rebelo A.R., Cai H.Y. Prion protein genotypes of sheep as determined from 3343 samples submitted from Ontario and other provinces of Canada from 2005 to 2012. *Can. J. Vet. Res.*, 2014, 78: 260-266.
 38. Otelea M.R., Zaulet M.M., Dudu A., Otelea F., Baraitareanu S., Danes D. The scrapie genetic susceptibility of some sheep breeds in southeast Romanian area and genotype profiles of sheep scrapie infected. *Rom. Biotech. Lett.*, 2011, 16(4): 6419-6429.
 39. Garcia-Crespo D., Juste RA, Hurtado A. Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of *PrP* gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Vet. Res.*, 2005, 1: 3 (doi: 10.1186/1746-6148-1-3).