

УДК 575.13.113

Г.Г. СЛИВИНСКИЙ<sup>1</sup>, Р. ТЛЕУЛИЕВА<sup>2</sup>, А.Б. БЕКЕНОВ<sup>1</sup>, А.М. МЕЛДЕБЕКОВ<sup>1</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОМОСОМНЫХ НАБОРОВ ГОРНЫХ БАРАНОВ, ОБИТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ КАЗАХСТАНА

(<sup>1</sup>ДГП Институт зоологии, <sup>2</sup>ДГП Институт молекулярной биологии и биохимии РГП ЦБИ КН МОН РК)

Дано описание хромосомных наборов самцов из основных популяций и группировок горных баранов, обитающих в Казахстане. Показано, что устюртский горный баран (*Ovis vignei arcal*) имеет диплоидный набор характерный для уриалов ( $2n=58$ ,  $NF=60$ ). Горные бараны, обитающие на территории Казахского мелкосопочника (*O.a.collium*), на Тянь-Шане (*O.a.karelini*), Тарбагатае и Чу-Илийских горах имеют типичные для архаро-аргалоидных баранов наборы с  $2n=56$  и  $NF=60$ . Обсуждаются вопросы, связанные с эволюцией кариотипа и распределением хромосомно различающихся форм горных баранов в Казахстанской части ареала.

Горные бараны (*Ovis* Linnaeus, 1758), населяющие сегодня горные системы Юга Европы, Азии, Сибири и Северной Америки, всегда имели большое значение в жизни человека. В историческом прошлом они являлись источником для выведения одного из важнейших видов домашних животных – домашних овец. В настоящее время горные бараны являются генетическим ресурсом для улучшения имеющихся пород домашних овец и создания новых высокопродуктивных гибридных форм.

Изучение генетического полиморфизма горных баранов представляет интерес для выяснения одного из наиболее сложных вопросов систематики млекопитающих и имеет практическую значимость для совершенствования мер охраны, воспроизводства и рационального использования этих редких животных. Для успешной реализации мероприятий по сохранению и воспроизводству горных баранов необходимо выяснить происхождение и генетический статус отдельных популяций. Однако, несмотря на длительную историю изучения, до настоящего времени не выработано единого взгляда на систематику этой группы [1].

Заметный прогресс в систематике горных баранов произошел во второй половине прошлого века, когда были обнаружены различия в хромосомных числах у архаров, муфлонов и уриалов [2, 3]. В последующие годы, в результате кариотипирования диких баранов из Армении, Таджикистана, Узбекистана, России, а также Ирана и Китая [3-8], было установлено, что все горные бараны Евразии подразделяются на 4

хромосомно различающиеся формы: снежных баранов (*O.nivicola*) с диплоидным числом хромосом  $2n=52$ , муфлонов (*O.orientalis*) – 54, архаров и аргали (*O.ammon*) – 56 и уриалов (*O.vignei*) – 58.

Из выделяемых сегодня систематиками 5-6 форм (подвидов) горных баранов, обитающих в Казахстане, кариотип описан только у эндемика Казахстана – каратауского архара (*O.a.nigrimontana*) [2]. Вместе с тем, изучение кариотипов у различных популяций и группировок из Казахстанской части ареала горных баранов может быть полезным для уточнения их таксономического статуса. В частности, необходимо выяснение принадлежности к той или другой хромосомной группе устюртского (транскаспийского) горного барана, так как в различное время его относили и к архарам (*Ovis ammon arcal*) [9], и к подвиду азиатского муфлона (*Ovis orientalis arcal*) [10], и к подвиду уриала (*Ovis vignei arcal*) [3]. Кроме этого, еще в недавнем историческом прошлом ареал устюртского барана смыкался с ареалом копетдагского барана (форма уриал,  $2n=58$ ) и с ареалом кзылкумского барана (форма архар,  $2n=56$ ).

В этой связи целью данной работы было описание хромосомных наборов горных баранов из Центрального, Восточного, Юго-Восточного и Западного Казахстана.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал для исследования был получен от взрослых самцов в возрасте 7-12 лет, добытых при проведении лицензионных охот в рамках про-

граммы научных исследований в соответствии с Постановлением Правительства Республики Казахстан №1035 от 14 октября 1998 г. «О проведении научно-исследовательских работ по изучению возможности изъятия животных, занесенных в Красную Книгу РК, 1998-2002 гг.».

Были исследованы хромосомные наборы самцов *O.a. collium* (Егиндыбулакский р-н, Карагандинская обл.), *O.a. karelini* (Нарынкольский р-н, Алматинская обл.), группировки баранов из отрогов Чу-Илийских гор (гора Джамбул, Мойынкумский р-н, Жамбылская обл.), горных баранов из Восточно-Казахстанской области (Тарбагатайский р-н, хребет Тарбагатай), устюртского горного барана – *O. vignei arcal* (Актау-Бузачинский заказник, Мангистауская обл.).

Для цитогенетического анализа мы использовали культивируемые клетки кожи. В сравнении с традиционно используемыми для этих целей лимфоцитами крови и кариоцитами костного мозга, культивируемые клетки кожи обладают целым рядом преимуществ: а) изолированные с соблюдением мер асептики биопсийные образцы кожи сохраняют жизнеспособность на протяжении 2-3 суток, что существенно упрощает задачу, связанную с необходимостью транспортирования образцов к месту проведения лабораторных экспериментов; б) клетки кожи достаточно легко культивируются *in vitro*; в) наличие постоянной клеточной культуры позволяет подобрать необходимые условия для получения цитогенетических препаратов.

Для введения в культуру биопсийные образцы клеток кожи животных размером 0,02- 0,03 см<sup>2</sup> выделяли с соблюдением мер асептики из внутренней поверхности уха, помещали в контейнер, содержащий 50 мл среды RPMI-1640 с антибиотиками, и транспортировали в лабораторию в течение 1-2 суток при 8-10°C. Первичные культуры были получены путем культивирования кусочков кожи размером 1мм<sup>2</sup> в 24-х луночных планшетах с диаметром лунок равным 2 см, которые содержали полную среду RPMI-1640 и 10% сыворотки эмбрионов коров. Для фиксации образцов на дне лунок их покрывали покровными стеклами. Установлено, что культивирование на пластиковом субстрате в небольшом объеме среды создает лучшие условия для миграции клеток из эксплантата и их пролиферации.

При подборе оптимальных условий для пролиферации устойчивый рост клеток был получен



Рис. 1. Внешний вид культивируемых клеток кожи самца из Чу-Илийских гор (гора Джамбул)

в среде RPMI-1640 с 10-15% сыворотки эмбрионов коров со стандартными добавками при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После образования монослоя культуры пересевали, предварительно снимая клетки щадящей трипсинизацией (0,25% раствор трипсина в течение 15 мин при 37°C).

Все полученные культуры были представлены клетками одного типичного для фибробластов морфотипа (рисунок 1).

Цитогенетические препараты были получены из культивируемых клеток на первых пассажах. Для получения метафазных пластинок на 20 ч культивирования клетки синхронизировали, выдерживая культуральные сосуды при 4°C 40 мин. Через 24 ч культивирования в культуральную среду добавляли колхицин в конечной концентрации 0,08 мкг/мл и инкубировали 2,5-3 ч. По окончании культивирования среду сливали, в культуральный сосуд добавляли небольшое количество 0,25% трипсина и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. После этого проводили легкое пипетирование с целью суспендирования наиболее легко отделяющихся митотических клеток. Трипсинат отмывали один раз, к осадку клеток приливали гипотонический раствор, содержащий равные по объему доли 0,075 М KCl и 0,9% раствора цитрата натрия. Клетки инкубировали в гипотоническом растворе 50 мин, после чего их трижды фиксировали охлажденной смесью из метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Суммарное время фиксации – 45 мин.

Препараты готовили как путем высушивания на воздухе, так и методом выжигания. Окраску проводили красителем Гимза в фосфатном буфере при нейтральном значении pH. Окрашенные

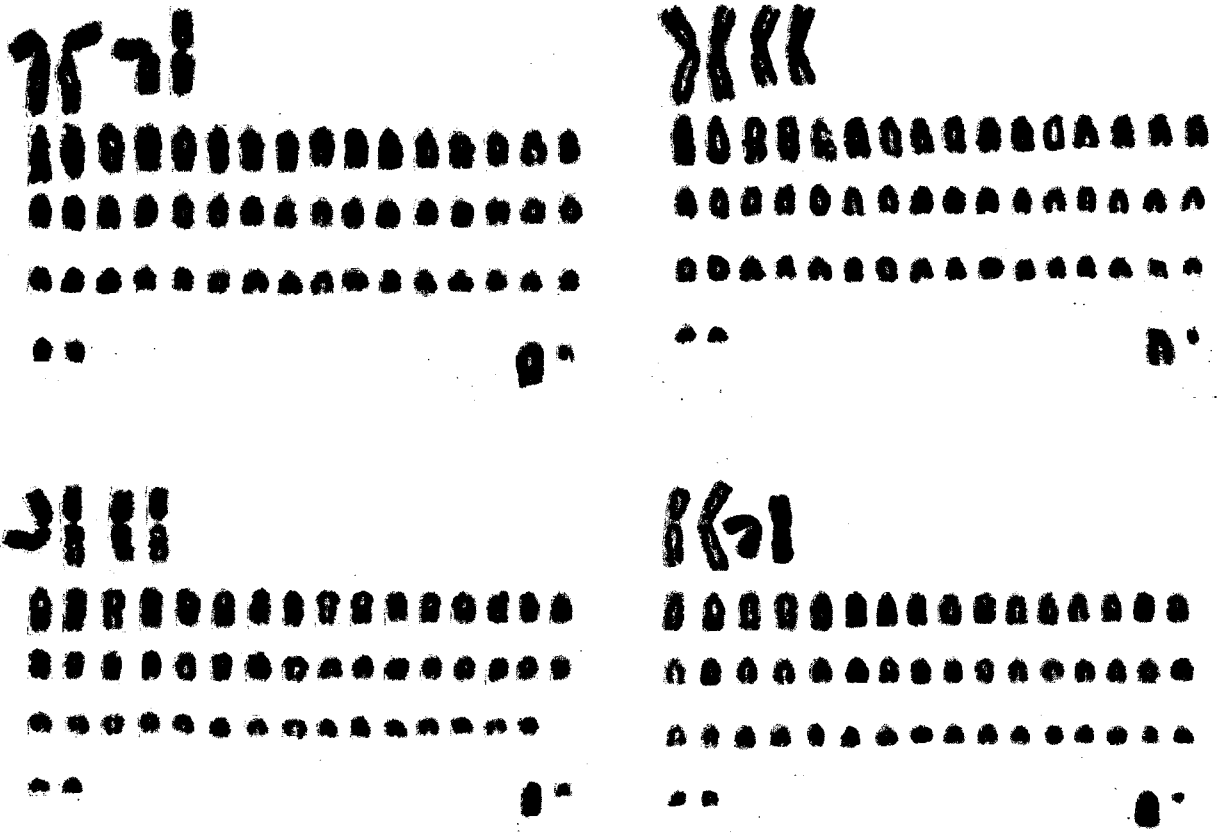


Рис. 2. Хромосомные наборы самцов *O. a. collium* (а), *O. a. karelini* (б), архаров из Чу-Илийских гор (в) и хребта Тарбагатай (г)

препараты промывали, высушивали, после чего их просматривали и фотографировали с помощью фотомикроскопа ICM-405 (Opton Германия), объектив x100.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты цитогенетического анализа горных баранов, обитающих в Центральном, Восточном и Юго-Восточном Казахстане показали, что все они имеют хромосомные наборы типичные для архаров и аргали с диплоидным числом хромосом  $2n=56$  и числом плеч  $NF=60$ . Хромосомные наборы *O. a. collium*, *O. a. karelini*, самцов из Чу-Илийских гор (гора Джамбул) и хребта Тарбагатай приведены на рисунке 2.

У всех изученных экземпляров ряд аутосом представлен двумя парами наиболее крупных хромосом – метацентриков. Остальные 25 пар составляют

ряд монотонно убывающих по величине акроцентрических хромосом. Большинство из них

имеют терминально расположенную центромеру. X – хромосома является крупным акроцентриком. Y – хромосома у исследованных нами форм имеет, скорее всего, метацентрическое или субметацентрическое строение (рисунок 3).

Хромосомные наборы самцов *O. a. collium*, *O. a. karelini* и баранов из Чу-Илийских гор и Тарбагатай аналогичны таковым у ранее изученных *O. a. przhewalski* из Центрального Алтая [3], северо-китайского барана *O. a. jubata* из Ганьсу [6] и барана Северцова (*O. a. severtzovi*) из Нуратинских гор [11].

Следовательно, горные бараны, населяющие восточную часть территории Казахстана, представлены одной 56-хромосомной формой архаро-аргалоидных баранов. Идентичность хромосомных наборов у описанных нами форм, по-видимому связана с тем, что они населяют по определению Н.Н.Воронцова и соавт.[3] территорию т.н. кругобалхашского кольца. Здесь тьяншанская форма *O. a. karelini* на западе в Сырда-

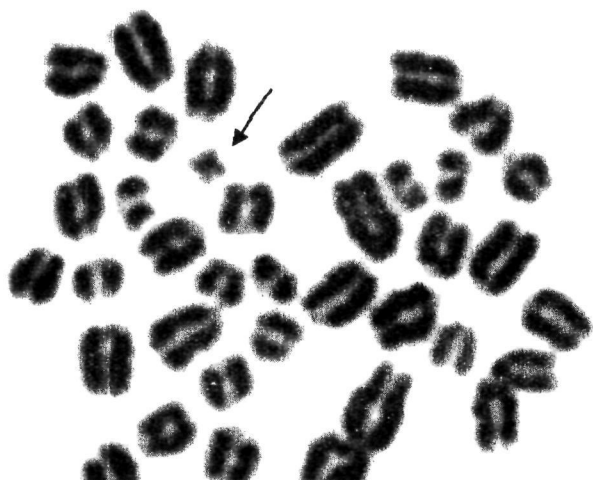


Рис. 3. Фрагмент метафазной пластинки самца *O.a.collium*.  
Стрелкой указана Y-хромосома

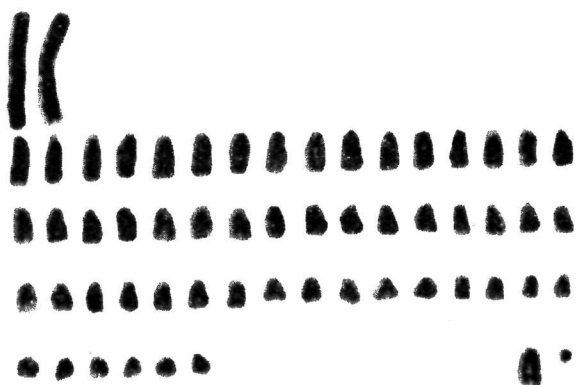


Рис. 4. Хромосомный набор самца устьюртского горного барана *O.vignei arcal*

рьянском Каратау соприкасается с ареалом каратауского барана *O.a. nigrimontana*. Через Чу-Илийские горы ареал *O.a. karelini* граничит с населяющим Казахское нагорье казахстанским бараном. На юге ареал тяньшанского архара соединяется в Джунгарском Алатау с формой *O.a. littledalei*, а последняя на севере, через хребты Тарбагатай и Барлык, соединяется с *O.a. collium*, замыкая кольцо.

Был исследован также хромосомный набор самца устьюртского горного барана из северо-западной части его ареала (Актау-Бузачинский заказник).

Диплоидный набор изученного нами экземпляра (рисунок 4) оказался типичным для уриалов ( $2n=58$ ; NF-60) и состоит из одной пары метацентриков и 27 пар акроцентрических хромосом. Гетерохромосомы не отличаются от таковых у представителей рода *Ovis*: X-хромосома –

крупный акроцентрик, а Y-хромосома – мелкий мета- или субметацентрик.

При определении принадлежности устьюртского горного барана к формам уриал или архар результаты кариотипирования являются решающими. Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что исследованный нами экземпляр устьюртского (транскаспийского) горного барана является 58-хромосомным уриалом и, следовательно, ареал *O. vignei arcal*, в его северо-западной части, населен именно этой формой горных баранов. Не исключено, однако, что бараны, обитающие в крайней юго-восточной части ареала, могут быть представлены и иными хромосомными формами, так как еще в историческое время, в районе юго-восточного чинка Устьюрта, ареал устьюртского (транскаспийского) барана почти смыкался с ареалом кызылкумского барана (*O.a.severtzovi*) в хромосомном наборе которого содержится 56 хромосом [11].

Н.Н.Воронцов и соавт. (1972) полагают, что различия в хромосомных числах являются решающим свидетельством в пользу видовой самостоятельности горных баранов [3]. В то же время ряд авторов [12] указывает на то, что с точки зрения традиционной концепции вида, их нельзя рассматривать как полноценные виды, так как все разнохромосомные формы баранов способны к неограниченному скрещиванию и дают плодовитое потомство.

Полученные к настоящему времени данные о микроморфологии хромосом с применением различных способов дифференциальной окраски показали практически полное сходство между гомеологичными хромосомами не только у представителей рода *Ovis*, но и среди представителей различных родов трибы Caprini [12]. У овцы и козы не выявлено различий в GTG – структурах аутосом и X-хромосомы при анализе G – рисунков хромосом высокого разрешения [13]. Наличие в кариотипах горных баранов крупных хромосом с идентичным G-рисунком и большого числа мелких аутосом – акроцентриков с трудно выявляемым индивидуальным рисунком не позволяет сегодня использовать методы кариосистематики для дифференциации различных популяций, имеющих одинаковые хромосомные наборы. Возможно, это станет реальным в будущем, когда будет разработана устойчивая номенклатура хромосом этих животных.

В свете этих данных большой неожиданностью стало сообщение о том, что у ряда подвидов архара, в том числе у обитающих на Тибете *O.a.dalai-lamae* и *O.a.hodgsoni*, а также у обитающего в Гобийском Алтае барана Дарвина (*O.a.darvini*), Y-хромосома является акроцентриком, тогда как у других подвидов архара, уриалов, муфлонов и домашних овец она имеет метацентрическое строение [8]. Существование среди 56-хромосомных архаров двух групп, которые различаются морфологией Y-хромосомы, допускает возможность их независимого происхождения и ставит под сомнение гипотезу о монофилетическом происхождении ныне существующих форм горных баранов от одного предкового вида. Описанные выше результаты заставляют также вернуться к более тщательному изучению морфологии Y-хромосомы у ранее кариотипированных форм, так как ее строение из-за небольших размеров не всегда удается точно установить.

Предполагается, что различия в хромосомных числах у горных баранов от 52 (снежный баран) до 58 (уриал) являются следствием случайных Робертсоновских транслокаций [12, 14], а эволюционные преобразования кариотипа шли в направлении убывания числа хромосом от  $2n=58$  до  $2n=52$  [15, 16]. На основании этих допущений, а также имеющихся данных палеонтологии, высказывалось предположение, что на территории Евразии наиболее древней, примитивной формой является уриал [3].

В настоящее время мы не знаем вследствие каких причин западная часть ареала горных баранов в Казахстане представлена именно этой формой, тогда как в его восточной части обитают 56-хромосомные архары. Граница, разделявшая в историческом прошлом ареалы этих двух хромосомно различающихся форм, также не известна, однако не исключено, что она пролегла через территории, где в настоящее время обитают реликтовые формы архара – кзылкупумский и каратауский горные бараны по внешним морфологическим признакам сходные с уриалом, но по структуре кариотипа относящиеся к архарам.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Данилкин А.А. Палорогие (Bovidae). М., 2005. – 550 с.
2. Schmitt J., Ulbrich F. Die Chromosomen verseniender Caprini // Zeitschr. F. Säugetierkunde. – 1968. В.33, Н.3. S.180-186.
3. Воронцов Н.Н., Коробицина К.В., Надлер И.Ф., Хоффман Р., Сапожников Г.Н., Горелов Ю.К. Цитогенетическая дифференциация и границы видов у настоящих баранов (*Ovis s. str.*) Палеарктики // Зоол. журнал. 1972. Т. 51. вып.8. С. 1109-1122.
4. Коробицина К.В., Воронцов Н.Н. Хромосомные наборы диких баранов и пути использования генофонда рода *Ovis* в отдаленной гибридизации с домашними овцами // Биологические исследования на Дальнем Востоке. Владивосток, 1975. С.153-158.
5. Шарипов И.К. Кариотип домашних и диких овец. Алма-Ата, 1989. 142с.
6. Bunch T.D., Mitonell R.M., Macilius A. G-banded chromosomes of the Gansu argali (*Ovis ammon Jubata*) and the implication on the evolution of the *Ovis* karyotype // J.Hered. 1990. Vol.81. P.227-230.
7. Ляпунова Е.А., Банч Е.Д., Воронцов Н.Н., Хоффман Р.С. Хромосомные наборы и систематическое положение барана Северцова (*Ovis ammon severtzovi*) // Зоол. журнал. 1997. Т.76. № 9. С.1083-1093.
8. Bunch T.D., Wong S., Valder R., Hoffman R.S., Zhang Y., Liu A., Lin S. Cytogenetics, morphology and evolution of four subspecies of the Giant Sheep argali (*Ovis ammon*) of Asia // Mammalia. 2000. -Vol 64. № 2. P. 199-207.
9. Мамбетжумаев А.М. Об экологии устюртского архара (*Ovis ammon Eversmann*) // Пушные промысловые звери Каракалпакии. Ташкент, 1968. С.62-69.
10. Саинов Е.Ф., Бекенов А.Б. Азиатский муфлон *Ovis orientalis* Gmelin, 1774 // Млекопитающие Казахстана. Т.3, Ч.3. Парнокопытные. Алма-Ата, 1983. 246 с.
11. Ляпунова Е.А., Банч Е.Д., Воронцов Н.Н., Хоффман Р.С. Хромосомные наборы и систематическое положение барана Северцова (*Ovis ammon severtzovi*) // Зоол. журнал. 1997. Т.76, №9. С.1083-1093.
12. Орлов В.Н. Систематика горных баранов и происхождение домашних овец по кариологическим данным // Эколого-морфологические особенности диких родичей домашних овец. М., 1978. С. 5-17.
13. Кафтмановская Е.М. Исследование дифференциально окрашенных хромосом овец, крупного рогатого скота и козы // Автореф. дис... канд. биол. наук. Новосибирск, 1993.
14. Коробицина К.В., Воронцов Н.Н. Хромосомные наборы диких баранов и пути использования генофонда рода *Ovis* в отдаленной гибридизации с домашними овцами // Биологические исследования на Дальнем Востоке. Владивосток, 1975. С.153-158.
15. Korobitsina K.V., Nadler Ch.F., Vorontsov N.N., Hoffman R.S. Chromosomes of the Siberian snow sheep *Ovis nivicola* and implication the origin of Amphiberingian wildsheep (Subgenus *Pachyceros*) // Quatern. Res. 1974, Vol. 4. P.235-245.
16. Nadler Ch.F., Korobitsina K.V., Hoffman R.S., Vorontsov N.N. Cytogenetic differentiation, geographic distribution and domestication in Palearctic sheep (*Ovis*) // Zeitschr.F. Säugetierkunde. 1973. Vol.38. P.109-125.

Резюме

Қазақстан аумағында мекендейтін арқарлар құятасының хромосомалық құрамының популяциялық және топтық құрамы сипатталған. Зерттеу нәтижесі, Үстірт арқарының (*Ovis vignei arcal*) диплоидты құрамы уриалдың сипаттамасына ( $2n = 58$ ,  $NF=60$ ) тән екендігін көрсетті. Сарыарқада, (*O.a.collium*), Тянь Шань тауында, (*O.a.karelini*), Тарбағатайда, Шу-Іле таулары арқарлардың аргалоидты-арқар типіне ( $2n = 56$ ,  $NF=60$ ) жатаындығын көрсетті. Қазақстан аумағында тараған арқарлардың кариотиптерінің эволюциялық байланысы және арқарлардың хромосомалар арқылы бөлінуі ерекшеліктері талқыланды.

Summary

The description of chromosomal complements of mails from the basic populations and groups of the mountain sheep dwells in Kazakhstan is given. It is shown, that the Ustyurt mountain sheep (*Ovis vignei arcal*) has the dyploid chromosomal complement with  $2n=58$  and  $NF=60$ , characteristic for the urial's groop. The mountain sheep inhabits the Kazak uplands (*O.a.collium*), Tian-Shan mountains (*O.a.karelini*), Tarbagatai and Chu-Ili mountains have typical for argali sets with  $2n = 56$  and  $NF=60$ . The questions connected with evolution of cariotype and distribution of chromosomal differing forms of mountain sheep in the Kazakhstan part of an area are discussed.