

УДК 575.577.636.1

КУРИЛЕНКО Ю.Ф., аспірант

Науковий керівник – **КОСТЕНКО С.О.**, канд. біол. наук

СУПРУН І.О., канд. с.-г. наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Yura236@ukr.net

ОЦІНКА МІЖПОРОДНОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ КОНЕЙ ЗА ВИКОРИСТАННЯ ISSR-МАРКЕРІВ

Проведено оцінювання міжпородної диференціації 128 представників 5 популяцій коней (арабська, орловська рисиста, новоолександрівська ваговозна, чистокровна верхова породи, коні Пржевальського) за використання двох ISSR-маркерних систем на основі праймерів (AGC)₆G та (ACC)₆G. Отримані результати свідчать, що полілокусні спектри ISSR-PCR маркерів мають виражену породну специфічність, їх поліморфізм залежить від фрагмента мікросателітного локусу, що використовується як праймер і дає змогу виявити як специфічні особливості поліморфізму різних геномних ділянок, так і консервативні за довжиною фрагменти ДНК. Найбільш поліморфною за обома маркерними системами виявилась новоолександрівська ваговозна порода. Для коней чистокровної верхової, орловської рисистої, новоолександрівської ваговозної порід та коней Пржевальського виявлено специфічні алелі, які можна вважати абсолютними маркерами під час їх ідентифікації.

Ключові слова: популяція, порода коней, локус, ISSR-типування, маркерна система, праймер, рівень поліморфізму, очікувана гетерозиготність, індекс гетерогенності Шеннона, ефективна кількість алелів.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. Важливим аспектом збереження та відтворення різних сільськогосподарських видів, у тому числі коней, є моніторинг генетичного поліморфізму популяцій. Нині такий аналіз здійснюють за допомогою ДНК-технологій, що базуються на використанні різних типів ДНК-маркерів. Одним із варіантів є ампліфікація міжмікросателітних фрагментів ДНК, які розташовані між двома інвертованими SSR-локусами геному – ISSR-PCR [2, 4]. ISSR-типування базується на використанні праймерів, комплементарних обраному мікросателітному мотиву [5, 9]. Порівняно з іншими методами мультилокусного профілювання він характеризується кращою відтворюваністю і ефективно використовується для виявлення внутрішньовидової та міжвидової генетичної мінливості, ідентифікації видів та популяцій [1, 10, 11].

Метою досліджень було оцінювання та аналіз міжпородного генетичного поліморфізму коней за використання ISSR-маркерів.

Матеріал і методика дослідження. Для проведення досліджень було відібрано зразки біологічного матеріалу у 112 представників 5 популяцій коней: арабська, новоолександрівська ваговозна породи (Ягільницький кінний завод), орловська рисиста (Київський державний іпподром), чистокровна верхова порода (Дніпропетровський кінний завод), коні Пржевальського (біосферний заповідник «Асканія-Нова»). Геномну ДНК виділяли із крові та волосяних фолікулів коней за допомогою комплекту реактивів «ДНК-сорб В» (АмпліСенс, Росія). У випадку виділення ДНК із волосяних фолікулів подовжували час лізису до 2 год.

Концентрацію ДНК і ступінь її чистоти визначали за допомогою приладу NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Німеччина). Всі проби доводили до робочої концентрації 20 нг/мкл.

Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі «Терцик» (Росія) за таким температурним режимом: початкова денатурація – 4 хв за температури 94 °С; 32 цикли: 30 с за 94 °С, 30 с за 58 °С, 2 хв за 72 °С; термінальна елонгація – 5 хв за 72 °С.

Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ дНТФ, 1,0 од. Таг-полімерази, 40-80 нг ДНК, 1,5-1,8 мМ MgCl₂ і 0,4-0,5 мкМ праймера. Оптимальну концентрацію кожного з компонентів реакції підбирали експериментально.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 1,5 %-му агарозному гелі за використання 0,5×TBE-буфера за постійної напруги 100 В протягом 80 хв. Після закінчення електрофорезу гель обробляли бромистим етидієм (0,5 мкг/мл), візуалізували під УФ-променями і фотографували цифровою камерою Panasonic DMC-FS42. Для визначання розміру продуктів

ампліфікації використовували маркер GeneRuler 100 bp ("Fermentas", Литва). Дослідження виконано на базі лабораторії генетики Інституту розведення та генетики тварин НАНУ.

Результати досліджень та їх обговорення. Міжпородну диференціацію проводили між чотирма породами коней (2 верхових, 1 рисиста, 1 ваговозна) та кіньми Пржевальського за використання двох ISSR-систем на основі праймерів (AGC)₆G (маркерна система S1) та (ACC)₆G (маркерна система S2).

У таблиці 1 наведено показники генетичної мінливості досліджених популяцій коней за маркерною системою S1.

Таблиця 1 – Популяційно-генетична характеристика коней різних популяцій за маркерною системою ISSR-S1

Популяція	n	Локусів		H _e	N _a	I	Кількість специфічних алелів
		виявлених	% поліморфних				
А	16	13	30,76	0,080	0,773	0,115	-
П	16	13	23,08	0,046	0,727	0,069	2
Р	32	11	27,27	0,066	0,636	0,092	1
Н	32	16	50,00	0,152	1,091	0,221	6
Ч	32	12	33,33	0,074	0,727	0,108	-

Примітка: різниця вірогідна $p < 0,05$. H_e – очікувана гетерозиготність, N_a – середня кількість алелів на локус, I – індекс гетерогенності Шеннона. А – арабська порода, П – кінь Пржевальського, Р – орловський рисак, Н – новоолександрівський ваговоз, Ч – чистокровна верхова порода.

Кількість виявлених локусів за цією маркерною системою варіює від 16 у коней ваговозної породи (50 % поліморфні), до 11 у рисаків з рівнем поліморфізму 27,27 % (рис. 1). Найменш поліморфною популяцією серед досліджених виявились коні Пржевальського, відсоток поліморфних локусів у яких становить 23,08, очікувана гетерозиготність – 0,046, індекс гетерогенності Шеннона – 0,069.

Для новоолександрівської ваговозної породи були характерні найвищі показники рівня гетерозиготності (0,152) та генетичної біорізноманітності (I=0,221). Це порода є менш консолідованою порівняно з іншими дослідженими популяціями, що може бути обумовлено меншою інтенсивністю штучного добору порівняно з породами спортивного напрямку використання (верховими і рисистими).

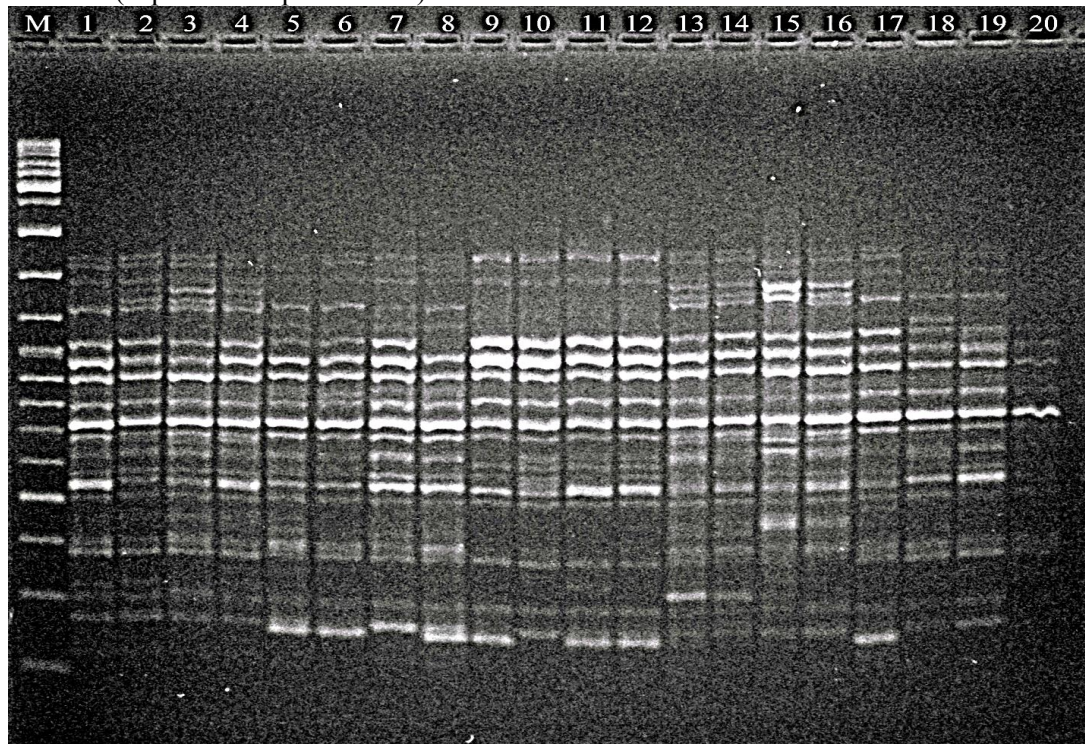


Рис. 1. Електрофоретичні спектри ISSR-ампліфікації з ДНК коней за використання праймера (ACC)₆G:

М – маркер молекулярних розмірів (GeneRuler DNA Ladder Mix 100bp, Fermentas), 1–4 – арабська порода, 5–8 – коні Пржевальського, 9–12 – орловська рисиста, 13–16 – новоолександрівський ваговоз, 17–20 – чистокровна верхова порода.

Константними зонами ампліфікації за маркерною системою S1 наявними у всіх тварин, незалежно від породи, були фрагменти розмірами 1270, 970, 920, 670 і 420 п. н. Поряд із спільними для досліджених порід ПЛР-продуктами в полілокусних спектрах фрагментів ДНК виявлено і породоспецифічні особливості. Так, фрагменти розміром 1070, 820, 760, 650, 620 і 530 п.н. були характерними лише для коней новоолександрівської ваговозної породи і зустрічались із частотами 0,375, 0,500, 0,500, 0,625, 0,750 і 1,000 відповідно. Найдовший фрагмент розміром 1400 п.н. виявлено лише у орловських рисаків із частотою 0,625, тимчасом для коней Пржевальського були характерні два специфічні фрагменти розмірами 1360 і 850 п.н. з частотою 0,625 і 0,125 відповідно. Три фрагменти розмірами 360, 900 і 1010 п.н. зустрічали у всіх досліджених популяціях у більшості тварин з частотою вище середньої. Два фрагменти розміром 580 і 560 п.н. спостерігали у всіх досліджених популяціях, крім коней новоолександрівської ваговозної породи. Фрагмент розміром 380 п.н. був присутній у верхових порід коней і коней Пржевальського та зовсім не зустрічався у рисаків і ваговозів.

Аналізуючи різні поєднання зазначених вище фрагментів, можна дійти висновку, що кожна порода має свій специфічний ДНК-патерн. Столповським Ю. А. [10] для визначення породоспецифічного патерну у домашикованих видів було запропоновано використовувати лише фрагменти, які зустрічаються з частотою 0,4 і вище. Відтак, для новоолександрівської ваговозної породи виявлено 5 породоспецифічних локусів і по 1 локусу для орловських рисаків та коней Пржевальського.

Популяційно-генетичні показники досліджених популяцій коней за використання маркерної системи S2 на основі тринуклеотидного мотиву ACC наведено у таблиці 2.

Таблиця 2 – Популяційно-генетична характеристика коней різних популяцій за маркерною системою ISSR- S2

Популяція	n	Локусів		H _e	N _a	I	Кількість приватних алелів
		виявлених	% поліморфних				
А	16	20	30,00	0,104	1,083	0,152	-
П	16	17	29,41	0,072	0,917	0,109	1
Р	32	13	46,15	0,102	0,792	0,149	-
Н	32	20	55,00	0,190	1,292	0,276	2
Ч	32	19	36,84	0,099	1,083	0,148	1

Примітка: різниця вірогідна $p < 0,05$. H_e – очікувана гетерозиготність, N_a – середня кількість алелів на локус, I – індекс гетерогенності Шеннона. А – арабська порода, П – кінь Пржевальського, Р – орловський рисак, Н – новоолександрівський ваговоз, Ч – чистокровна верхова порода.

Під час ISSR-типування за маркерною системою S2 найвищі показники генетичної мінливості виявлено у коней новоолександрівської ваговозної породи (H_e=0,190, I=0,276, рівень поліморфізму 55 %). Значно вищий відсоток поліморфних локусів порівняно з S1 спостерігали в орловській рисистій породі. Популяція коней Пржевальського за цією маркерною системою виявилась найбільш генетично стабільною (очікувана гетерозиготність – 0,072, індекс Шеннона – 0,109). Для інших досліджених популяцій значення показників популяційно-генетичної мінливості варіювали незначно (0,099–0,104 за гетерозиготністю та 0,148–0,152 за індексом Шеннона).

Чотири фрагменти ДНК розміром 960, 900, 720 і 300 п.н. зустрічали у всіх коней досліджуваних порід і коней Пржевальського. Фрагменти розмірами 1350, 1150 і 400 п.н. також були відмічені у всіх популяціях з частотою вище середньої і водночас не спостерігались у рисаків.

За генетичною системою ISSR-S2 було виявлено унікальний ДНК-фрагмент розміром 850 п.н., притаманний лише коням Пржевальського (100 %), та фрагмент розміром 1050 п.н., що зустрічався лише у особин чистокровної верхової породи (0,250).

Досить унікальними в генетичному сенсі виявились тварини новоолександрівської ваговозної породи. Рідкісними алелями для них є 800 і 370 п.н. за їх стовідсоткової наявності у представників інших досліджених груп коней. Фрагменти розміром 670 і 320 п.н. зустрічали лише у коней арабської і ваговозної порід, 1020, 680 і 500 п.н. – зустрічались у всіх досліджених популяціях у більшості тварин з частотою вище середньої або абсолютною. Фрагмент ДНК розміром 1400 п.н. зареєстровано у всіх групах з частотою широкого діапазону: від 0,250 у коней

Пржевальського до 1,000 у арабської породи. Фрагмент розміром 1190 п.н. зустрічали у верхових порід коней (арабської – 0,500, чистокровної верхової – 0,125) та коней Пржевальського (1,000).

Фрагмент розміром 1280 п.н. зустрічали як у коней орловської рисистої породи (0,875), так і у особин чистокровної верхової (0,875), що може бути свідченням спільної предкової форми – арабської породи (1,000), яку використовували на початкових етапах створення цих порід.

За системою ISSR-S2 виявлено меншу загальну кількість специфічних фрагментів ДНК, так званих приватних алелів [1], зокрема для тварин новоолександрівської ваговозної породи – 2 (1100 і 450 п.н. з частотами 0,250 і 0,500 відповідно), чистокровної верхової – 1 (1050 п.н., частота 0,250). До породоспецифічних алелів за цією маркерною системою для коней новоолександрівської ваговозної породи можна віднести фрагмент розміром 450 п.н., оскільки у них він зустрічався з частотою вище 0,4.

Результат об'єднання даних за обома маркерними системами представлено на рисунку 2.

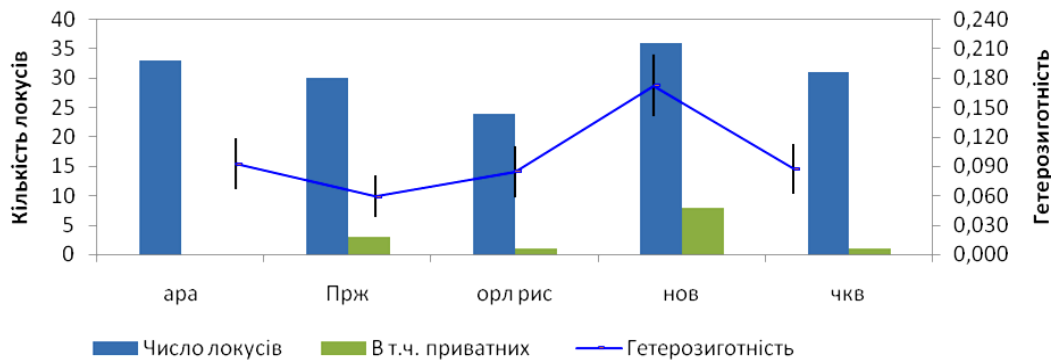


Рис. 2. Загальна кількість виявлених локусів та очікувана гетерозиготність (H_e) за результатами ISSR-типування за двома маркерними системами (S1+S2).

Таким чином, ДНК-фрагменти розміром 820, 760, 650, 620 і 530 п.н., які зустрічались з частотою відповідно 0,500, 0,500, 0,625, 0,750 і 1,000, за використання маркерної системи S1 можуть виступати надійним критерієм ідентифікації у коней новоолександрівської ваговозної породи. Зазначені фрагменти взагалі не зустрічались в інших досліджених популяціях коней.

Для коней Пржевальського видоспецифічними виявились фрагменти розмірами 1360 п.н. (за використання маркерної системи S1) та 850 п.н. (S2) з частотами 0,625 і 1,000 відповідно. Для коней орловської рисистої породи унікальною послідовністю ДНК є фрагмент розміром 1400 п.н. за використання маркерної системи S1.

Висновки. Результати порівняння генетичних структур порід коней і близькоспорідненого дикого виду (коня Пржевальського) свідчать про те, що полілокусні спектри ISSR-PCR-маркерів мають виражену породну специфічність. Їх поліморфізм залежить від фрагмента мікросателітного локусу, який використовують як праймер.

Апробовані ISSR-маркерні системи виявили достатній рівень поліморфізму для вивчення внутрішньовидової мінливості коней, що може бути використано для виявлення генофондних відмінностей у різних порід коней, а відтак, – оцінювання ймовірності породної належності тварин невідомого походження.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Aberle K. S. Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers / K.S. Aberle, H. Hamann, C. Drögemüller // *Animal Genetics*. – 2004. – Vol. 35. – P. 270–277.
2. Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using triand tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis L.) / Bornet B., Muller C., Paulus F., Branchard M. // *Genome*. – 2002. – Vol. 45. – P. 890–896.
3. Kuhl D.P.A. Trinucleotide repeats and genome variation / D.P.A. Kuhl, C.T. Caskey // *Curr Opin Genet. Dev.* – 1993. – Vol. 3. – P. 404–407.
4. Zietkiewicz E. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // *Genomics*. – 1994. – Vol. 20. – P. 176–183.
5. Бардуков Н. В. Профили ДНК-маркерів (ISSR-PCR) у лошадей рысистых пород / Н. В. Бардуков, Г. К. Коновалова, В. И. Глазко // *Изв. ТСХА*. – 2010. – № 6. – С. 152–157.

6. Березовская О.П. Внутри- и межвидовые различия в ISSR-PCR характеристике шмелей (HYMENOPTERA: BOMBINAE) / О.П. Березовская, О.Ю. Мороз, А.П. Сидоренко // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 3. – С. 28–35.
7. Воронкова В.Н. Сравнительный анализ информативности ISSR-маркеров для оценки генетического разнообразия пород лошадей / В. Н. Воронкова, Цэндсүрэн Цэдэв, Г. Е. Сулимова // Генетика. – 2011. – Т.47, № 8. – С. 1131–1134.
8. Глазко В.И. Введение в ДНК технологии и биоинформатику: [под ред. Т.Т. Глазко] / В.И. Глазко, Г.В. Глазко. – К., 2001. – 544 с.
9. Метлицька О.І. Методологія ДНК-паспортизації генофондів сільськогосподарських тварин за гіперваріабельними локусами геному: дис. на здобуття наук. ступеня доктора с.-г. наук: 03.00.15 / Метлицька Олена Іванівна. – Полтава, 2012. – 382 с.
10. Применение межмикросателлитного анализа ДНК для оценки популяционной структуры, идентификации и сходства генофондов пород и видов domestизированных животных / [Столповский Ю. А., Лазебный О. Е., Столповский К. Ю. и др.] // Генетика. – 2010. – Т.46, № 6. – С. 825–833.
11. Феофилов А. В. Дифференциация генофондов алтайской и рысистых пород лошадей по ISSR-PCR маркерам / А. В. Феофилов, Н. В. Бардуков, В. И. Глазко // Генетика. – 2011. – Т.47, № 9. – С. 1230–1235.

Оценка межпородной дифференциации лошадей при использовании ISSR-маркеров

Ю.Ф. Куриленко, И.А. Супрун

Проведена оценка межпородной дифференциации 128 представителей 5 популяций лошадей (арабская, орловская рысистая, новоолександровская тяжеловозная, чистокровная верховая породы, лошади Пржевальского) при использовании двух ISSR-маркерных систем на основе праймеров (AGC)₆G и (ACC)₆G. Полученные результаты свидетельствуют о том, что полилокусные спектры ISSR-PCR-маркеров имеют выраженную породную специфичность, их полиморфизм зависит от фрагмента микросателлитного локуса, который используется в качестве праймера и позволяет выявить как специфические особенности полиморфизма разных геномных участков, так и консервативные по длине фрагменты ДНК. Наиболее полиморфной за обеими маркерными системами оказалась новоолександровская тяжеловозная порода. Выявлены специфические аллели для лошадей чистокровной верховой, орловской рыистой, новоолександровской тяжеловозной пород и лошадей Пржевальского, которые могут использоваться как абсолютные маркеры при их идентификации.

Ключевые слова: популяция, порода лошадей, локус, ISSR-типирование, маркерная система, праймер, уровень полиморфизма, ожидаемая гетерозиготность, индекс гетерогенности Шеннона, эффективное число аллелей, приватные аллели.

Надійшла 28.10.2013.