

СПЕКТРЫ ISSR-PCR МАРКЕРОВ В ОЦЕНКАХ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КАРАЧАЕВСКОЙ ЛОШАДИ В ХОЗЯЙСТВАХ КАРАЧАЕВО-ЧЕРКЕССКОЙ РЕСПУБЛИКИ

Т.В. ГОЛИК, Т.А. ЭРКЕНОВ, Т.Т. ГЛАЗКО, В.И. ГЛАЗКО

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

*По данным FAO, в настоящее время особую актуальность приобретают вопросы, связанные с сохранением генетических ресурсов местных пород животных сельскохозяйственных видов, их генетического и фенотипического разнообразия. Местные породы интересны тем, что несут в своем геноме аллели и их сочетания, ассоциированные с возможностью адаптации к конкретным условиям окружающей среды. В работе выполнен анализ генотипов лошадей карачаевской породы из шести различных хозяйств Карачаево-Черкесской Республики по 41 локусу с применением методов генотипирования продуктов амплификации фрагментов геномной ДНК лошадей, фланкированных инвертированными повторами участков микросателлитных локусов  $(AG)_nC$ ,  $(GA)_nC$  и  $(GAG)_nC$  с использованием полимеразной цепной реакции (Inter-Simple Sequence Repeats – ISSR-PCR маркеры). На основании генотипирования 376 лошадей по 41 локусу можно сделать заключение о генетической дифференциации лошадей, воспроизводившихся в разных хозяйствах. По праймеру  $(GAG)_nC$  у исследованных лошадей найдено наименьшее количество полиморфных локусов - 16,6%, по праймеру  $(AG)_nC$  – 23,3%, наибольшее значение было получено по праймеру  $(GA)_nC$  – 35,7%. Получены данные, свидетельствующие о достаточно высокой степени консолидированности исследованной группы животных. Относительно повышенным полиморфизмом отличались спектры продуктов амплификации у лошадей из ООО «Икар», а наибольшей консолидированностью обладали животные из хозяйства «Карплемхоз».*

**Ключевые слова:** карачаевская порода лошадей, спектры продуктов амплификации, генетическая дифференциация, ISSR-PCR маркеры, консолидированность.

**Введение**

Одной из центральных проблем глобального животноводства, широко обсуждаемой в последние годы, являются факты ускоренного сокращения биоразнообразия животных сельскохозяйственных видов. Такое сокращение в разных странах вызывается самыми различными причинами, но основной из них является глобальное вытеснение местных пород животных небольшим количеством транснациональных, причем этот процесс не контролируется [16]. В целях организации, по крайней мере, мониторинга таких процессов, при Организации Объединенных Наций создана Организация по продовольствию и сельскому хозяйству (Food and Agricultural organization – FAO), включающая комиссию по мировым генетическим ресурсам сельскохозяйственных видов растений и животных. FAO опубликовала ряд докла-

дов, в которых наглядно продемонстрирована угрожающая тенденция исчезновения пород различных сельскохозяйственных видов животных [9]. Комиссия приходит к выводу, что одной из основных причин снижения биоразнообразия животных сельскохозяйственных видов связано с распространением заводских (коммерческих) пород с относительно высокой продуктивностью. Однако до сих пор в глобальном масштабе около 70% животноводческой продукции обеспечивается местными породами [16], обладающими большим запасом генетической изменчивости и высоким адаптивным потенциалом к эколого-географическим условиям их разведения. Важнейшим фактором, определяющим необходимость сохранения конкретной породы, является ее генетическая уникальность. Именно поэтому подробное изучение аллелофонда местных пород заслуживает особого внимания.

Сокращение породного разнообразия, в частности, у лошадей происходит с высокой скоростью, утрачено около 87 пород, из которых 71 порода Европы и Кавказа [17]. По данным FAO, Россия обладает десятой частью мировых породных ресурсов коневодства; Государственный реестр селекционных достижений включает 40 пород лошадей, среди которых половина представлена уникальными отечественными породами [4].

К настоящему времени исследования генетических структур выполняются с использованием, в основном, генотипирования по микросателлитным локусам, в частности, у лошадей [8]. В то же время, полногеномное секвенирование генома лошади свидетельствует о том, что суммарно микросателлитные локусы занимают только около 2% нуклеотидных последовательностей и частота их распределения по геному существенно варьирует от локуса к локусу [15].

Более того, отсутствует информация о структурно-функциональных особенностях микросателлитов с разным кором (нуклеотидные последовательности элементарной единицы тандемного повтора), а также микросателлитов с одинаковым кором, но локализованных в разных геномных участках. В этой связи особый интерес представляют именно те микросателлиты, которые на коротких расстояниях (не более 2,5 тысяч пар нуклеотидов) формируют инвертированные повторы, потенциально предрасположенные к формированию вторичных структур ДНК (петель), поскольку именно вторичные структуры ДНК могут вовлекаться в события, связанные с регуляцией генной экспрессии. Одним из методов, позволяющих генотипировать геномы животных одновременно по ряду локусов, фланкированных инвертированными повторами участков микросателлитов, является ISSR-PCR маркеры (Inter-Simple Sequence Repeats) [19]. В этом методе микросателлиты используются в качестве геномных «якорей» для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ранее нами было выполнено секвенирование таких «анонимных» фрагментов геномной ДНК лошади и крупного рогатого скота, фланкированных инвертированными повторами разных микросателлитов, и обнаружено, что, как правило, они являются продуктами рекомбинаций между мобильными генетическими элементами [3], то есть, ассоциированы с наиболее полиморфными геномными элементами. Относительно повышенный уровень полиморфизма фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов, позволяет получать представления о генетической структуре групп животных с высоким разрешением. В международной практике именно возможность подтвердить уникальность и консолидированности той или иной породы является основанием для включения ее в национальные программы по сохранению биоресурсов [17].

Составной частью программы по сохранению породы должен быть мониторинг ее генетической структуры, а также оценка степени внутривидовой дифференциации. Важно отметить, что необходимо отдельно вести контроль за аллелофондом жеребцов и маток. Это позволяет получить более объективную картину генетического профиля породы и, как следствие, прогнозировать ее уровень генетического разнообразия в следующем поколении [5].

Карачаевская порода лошадей является универсальной, она может использоваться как в сельскохозяйственном производстве, так и для конного туризма, спорта и охоты. До распада СССР в Карачаево-Черкесской Республике активно велась селекционная работа с этой породой, но после распада и перестройки племенная работа с ней практически прекратилась. Карачаевская порода лошадей является важным элементом этноса народа, проживающего на территории республики. Родиной карачаевской породы лошадей является верхнее течение реки Кубани и плоскогорье водораздела Черного и Каспийского морей [7].

География и климат республики очень разнообразны. Карачаево-Черкесская Республика расположена на склоне Большого Кавказа. По своему рельефу она делится на 3 основные части: предгорная равнина, сами предгорья и горы Большого Кавказа (они занимают две трети части всей площади республики). Там есть и зоны горных суровых степей и зоны прохладных широколиственных лесов, которые сменяются субальпийскими и альпийскими лугами. На территории республики расположен государственный природный биосферный заповедник – Тебердинский.

Целью настоящей работы являлось выяснение внутривидовой популяционно-генетической дифференциации лошадей карачаевской породы, воспроизводимых в разных хозяйствах Карачаево-Черкесской Республики, по полилокусным спектрам ISSR-PCR маркеров. Полученные данные позволяют оценить степень консолидированности породы и ее отличия при воспроизводстве в разных хозяйствах.

### **Материал и методика**

Исследования проводили в Центре нанобиотехнологий РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева в 2017–2018 гг.

В исследовании были использованы образцы крови карачаевской породы лошадей из следующих хозяйств:

ООО Племярепродуктор «Ахтамас» расположено в станице Сторожевой Зеленчукского района Карачаево-Черкесской Республики. В анализ вошли 47 кобыл и 6 жеребцов 1998–2008 гг., а также кобылки 2014 г. (47 гол. в возрасте 1 год).

ООО «Аргомак» расположено в селе Хасаут, Малокарачаевского района, КЧР. В анализ вошли 15 кобыл и 2 жеребца 2002–2012 гг., а также кобылки 2015 г. (15 гол. в возрасте 1 год).

ООО «Икар» Зеленчукского района, КЧР. В анализ вошли 19 кобыл и 4 жеребца 2001–2011 годов, а также кобылки 2015 г. (17 гол. в возрасте 2-х лет).

ООО «Карплемхоз» Джегутинского района, КЧР. В анализ вошли 5 жеребцов и 30 кобыл 2001–2010 гг., а также кобылки 2014 г. (30 гол. в возрасте 1 год).

ООО Племярепродуктор «Конезавод «Мустанг» расположен в Прикубанском районе, КЧР. В анализ вошли 43 кобылки и 10 жеребцов 2002–2013 гг., а также кобылки 2017 г. (43 гол. в возрасте около 1 года).

ООО КФХ «Дон» расположен в Прикубанском районе, КЧР. В анализ вошли 20 кобыл и 3 жеребца, а также 43 кобылки, рожденные в 2017 г.

В общей сложности выборка составила 376 животных. В процессе анализа все животные были разделены на группы в зависимости от хозяйства, пола, возраста и масти животного; в исследованных группах лошадей присутствовало три масти – вороная, гнедая, караковая. Помимо этого, было учтено эколого-географическое расположение хозяйства, из которых были получены образцы крови лошадей. Рассчитано расстояние между хозяйствами в км, а также их высота над уровнем моря (у.м.).

Образцы крови для проведения геномного сканирования были получены из яремной вены лошадей, после чего они были помещены в индивидуальные пробирки в ЭДТА. Все пробирки были промаркированы с указанием № животного и его

пола. Затем полученные пробы были транспортированы в Центр Нанобиотехнологий для дальнейшего анализа и помещены в холодильник (при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ ).

Геномную ДНК выделяли из периферической крови лошадей по стандартной методике [18] с использованием коммерческого набора «ДНК-Экстран-1» (Синтол, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

В настоящее время для генотипирования различных особей, исследования генофондов животных, описания их изменений под действием факторов естественного и искусственного отбора, а также для установления происхождения и поиска связей с фенотипическими признаками, активно используются микросателлитные последовательности ДНК [1, 2, 10–11].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по методике Зеткевича с соавторами [19] с небольшими изменениями. В качестве праймеров были использованы ди- и тринуклеотидные микросателлитные повторы с якорными нуклеотидами  $(AG)_6C$ ,  $(GA)_6C$  и  $(GAG)_6C$ . ПЦР проводили в объеме 20 мкл с использованием коммерческого набора реагентов ПЦР-РВ (Синтол, Россия). Состав реакционной смеси: ДНК – 2 мкл, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (2,5 мМ) – 2 мкл, 10-кратный ПЦР буфер – 2 мкл,  $MgCl_2$  (25 мМ) – 2 мкл, Taq-ДНК полимеразы с ингибирующими активностью ферментов антителами (5Е/мкл) – 0,2 мкл, праймер (10 пкмоль/реакцию) – 2 мкл, деионизированная вода – 10 мкл. Амплификация выполнялась по следующей программе: первичная денатурация ( $t = 94^{\circ}\text{C}$ , 2 мин.); денатурация ( $t = 94^{\circ}\text{C}$ , 30 с.), отжиг ( $t = 55^{\circ}\text{C}$ , 30 с.), элонгация ( $t = 72^{\circ}\text{C}$ , 2 мин.) – 35 циклов; финальная элонгация ( $t = 72^{\circ}\text{C}$ , 10 мин.), ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технологии, Россия). Продукты амплификации разделяли в горизонтальном 1,5% агарозном геле в TBE-буфере. Окрашивание гелей проводили бромистым этидием концентрацией 0,5 мкг/мл. Фрагменты ДНК визуализировали в УФ свете при помощи трансиллюминатора УВТ-1 (Биоком, Россия) с использованием системы гель-документации VITRAN-PHOTO (Биоком, Россия). Размеры фрагментов ДНК определяли при помощи маркера молекулярных масс 100 bp+1.5 Kb+3 Kb (12 фрагментов от 100 до 3000 bp) M27 (СибЭнзим, Россия).

Для обработки полученных данных использовались программы Adobe Photoshop, Microsoft Excel, TFGA. Каждый ампликон спектра рассматривали как один локус ДНК. Полиморфизм такого локуса оценивали по наличию-отсутствию ампликона соответствующей длины в спектрах.

Нами был выполнен расчет индекса PIC, который характеризует уровень гетерозиготности локусов – продуктов амплификации, исходя из представлений о том, что по каждому локусу исследованная группа животных находится в равновесном состоянии, соответствующем закону Харди-Вайнберга [13]. Полученные величины PIC усредняли по всем ампликонам каждого праймера у исследованных животных, при этом считалось, что значения индекса для непалиморфных локусов равнялись нулю. Расчет индекса PIC (Polymorphic Information Content) выполнялся по формуле для диаллельных локусов, для которых  $PIC=2f(1-f)$ , где  $f$  – частота одного из двух аллелей. Поскольку маркеры ISSR-PCR имеют доминантный характер проявления по присутствию продукта амплификации,  $f$  рассчитывали по формуле  $f = R/2$ , где  $R$  – частота встречаемости среди исследованных животных таких, у которых в спектрах продуктов амплификации отсутствовал фрагмент ДНК данной длины. Значение  $R$  рассматривалось как доля гомозигот по рецессивному аллелю.

На основании данных о распределении ампликонов по спектрам амплификации по методу Нея [14] были определены генетические дистанции между исследуемыми лошадьми из разных хозяйств. На основании данных генетических дистанций проведен кластерный анализ с использованием метода усреднения расстояний и построены дендрограммы как наиболее наглядный способ выражения взаимосвязей между животными [6].

## Результаты и их обсуждение

Выполнен сравнительный анализ генетических структур по полилокусным спектрам продуктов амплификации ISSR-PCR маркеров лошадей карачаевской породы из шести различных хозяйств Карачаево-Черкесской Республики: «Ахтамас» (100 гол.), «Аргомак» (32 гол.), «Икар» (40 гол.), «Карплемхоз» (65 гол.), «Дон» (43 гол.) и «Мустанг» (96 гол.).

У исследованных образцов крови лошадей отмечается сходный диапазон длин фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами разных микросателлитных локусов. В спектре продуктов амплификации, полученных при использовании в качестве праймера последовательности  $(GA)_9C$ , выявлено суммарно в образцах из 6-ти исследованных хозяйств 14 фрагментов ДНК. Каждый из этих фрагментов был рассмотрен как отдельный локус. Наибольший уровень полиморфизма по доле полиморфных локусов (P) наблюдается в хозяйствах ООО «Икар» и ООО «Аргомак» – 71,4% (табл. 1). Полиморфное информационное содержание (PIC) спектров продуктов амплификации, полученных при использовании в ISSR-PCR последовательностей  $(GA)_9C$ , в «Икаре» – 0,2974, а в «КПХ» в восемь раз ниже – 0,0353.

Таблица 1

### Полиморфное информационное содержание (PIC) и доля полиморфных локусов (P) спектров продукции амплификации по праймеру $(GA)_9C$

| Праймер $(GA)_9C$ | «Ахтамас» | «Аргомак» | «Карплемхоз» | «Мустанг» | «Дон»  | «Икар» |
|-------------------|-----------|-----------|--------------|-----------|--------|--------|
| PIC               | 0,1451    | 0,2162    | 0,0353       | 0,1318    | 0,1007 | 0,2974 |
| P, %              | 14,3      | 71,4      | 7,1          | 28,5      | 21,4   | 71,4   |

Таблица 2

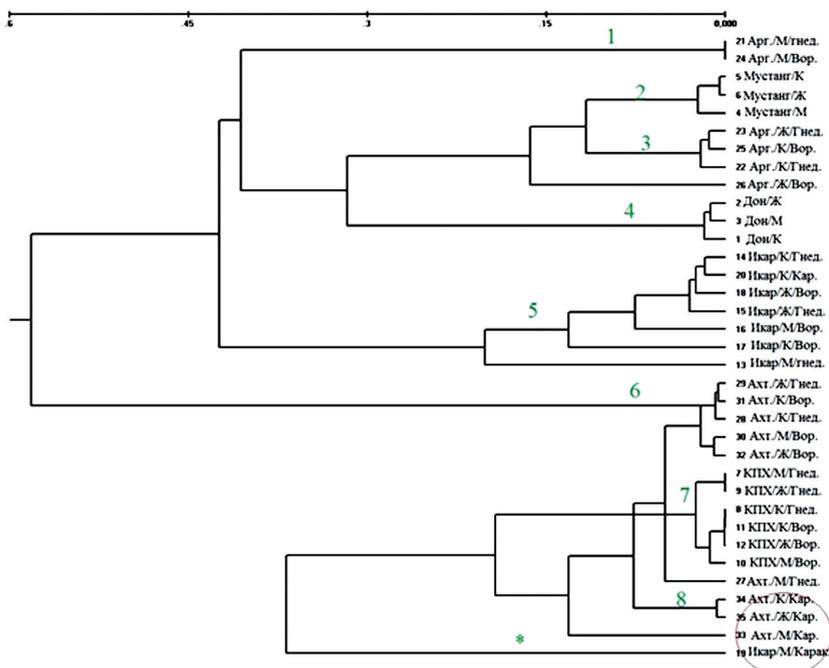
### Сравнительный анализ полиморфизма фрагментов ДНК по праймеру $(GA)_9C$ в хозяйствах «Ахтамас», «Аргомак», «Карплемхоз», «Мустанг», «Дон» и «Икар»

| П.О./Хоз.  | "Ахтамас" | "Аргомак" | "Икар" | "КПХ" | "Дон" | "Мустанг" |
|------------|-----------|-----------|--------|-------|-------|-----------|
| 1450-1400  | К         | П         | П      | К     | К     | К         |
| 1320-1300  | К         | П         | П      | К     | К     | К         |
| 1290-1250  | К         | П         | К      | К     | Н     | К         |
| 1210-1180  | Н         | Н         | Н      | К     | П     | Н         |
| 1050-1000  | К         | П         | П      | К     | П     | П         |
| 980-950    | К         | П         | П      | К     | Н     | Н         |
| 900-870    | К         | К         | К      | К     | К     | К         |
| 820-790    | К         | П         | П      | К     | П     | П         |
| 760-740    | К         | П         | П      | К     | К     | П         |
| 640-630    | П         | П         | П      | К     | К     | Н         |
| 580-560    | К         | П         | П      | П     | К     | П         |
| 550-530    | П         | П         | К      | К     | Н     | Н         |
| 520-500    | К         | К         | П      | К     | К     | К         |
| 400-380    | К         | К         | П      | К     | К     | К         |
| 14 локусов | 2         | 10        | 10     | 1     | 3     | 4         |

*Примечание.* «К» – консервативный участок ДНК по данному фрагменту; «П» – полиморфизм по данному фрагменту; «Н» – данный фрагмент ДНК отсутствует.

Из полученных данных можно сделать вывод, что спектры  $(GA)_9C$  наиболее полиморфны у лошадей из хозяйства «Икар». Участок в 900–870 п.о. является консервативным для всех лошадей (табл. 2). Также наиболее консервативными фрагментами являются ампликоны в районе длин 520–500, 400–380 пар оснований (полиморфизм по ним наблюдается только в хозяйстве «Икар»). Зона в 1210–1180 пар оснований отсутствует у лошадей из хозяйств «Ахтамас», «Аргомак», «Икар» и «Мустанг». У животных из хозяйства «Карплемхоз» почти все фрагменты спектра консервативны, кроме одного в районе 580–560 п.о.

С использованием метода М. Нея были рассчитаны индивидуальные генетические дистанции между лошадьми карачаевской породы из разных хозяйств. На основании полученных данных была построена дендрограмма, отображающая генетические взаимоотношения между лошадьми карачаевской породы, содержащихся в разных хозяйствах. На дендрограмме, построенной на основании распределения у исследованных животных фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами  $(GA)_9C$  (рис. 1), выделяются два крупных кластера, которые в свою очередь делятся на подкластеры, которым условно присвоены номера от 1–8: 1 подкластер – гнедые и вороные жеребцы хозяйства «Аргомак»; 2 подкластер – все лошади конезавода «Мустанг»; 3 подкластер – кобылы и жеребята хозяйства «Аргомак»; 4 подкластер – лошади хозяйства «Дон»; 5 подкластер – лошади хозяйства «Икар»; 6 подкластер – гнедые и вороные лошади хозяйства «Ахтамас»; 7 подкластер – лошади хозяйства «Карплемхоз»; 8 подкластер – жеребцы, кобылы и жеребята ПР «Ахтамас», а также жеребец из «Икара» караковой масти.



**Рис. 1.** Дендрограмма генетических взаимоотношений, построенных на основании генетических дистанций у лошадей карачаевской породы лошадей в шести различных хозяйствах по праймеру  $(GA)_9C$

В спектре продуктов амплификации праймера (AG)<sub>9</sub>C было обнаружено 15 воспроизводимых локусов (табл. 3, 4). По данному праймеру наибольший полиморфизм отмечен в хозяйстве «Икар», как и по праймеру (GA)<sub>9</sub>C. Наименьший показатель Р наблюдался в хозяйствах «КПХ» и «Дон»; по полиморфному информационному со- держанию их показатели так же совпадают.

Таблица 3

**Полиморфное информационное содержание (PIC) и доля полиморфных локусов (P) спектров продукции амплификации по праймеру (AG)<sub>9</sub>C**

|                             |           |           |              |           |        |        |
|-----------------------------|-----------|-----------|--------------|-----------|--------|--------|
| Праймер (AG) <sub>9</sub> C | «Ахтамас» | «Аргомак» | «Карплемхоз» | «Мустанг» | «Дон»  | «Икар» |
| PIC                         | 0,0811    | 0,1128    | 0,0557       | 0,1398    | 0,0551 | 0,2264 |
| P, %                        | 13,3      | 33,3      | 6,6          | 20,0      | 6,6    | 53,3   |

Таблица 4

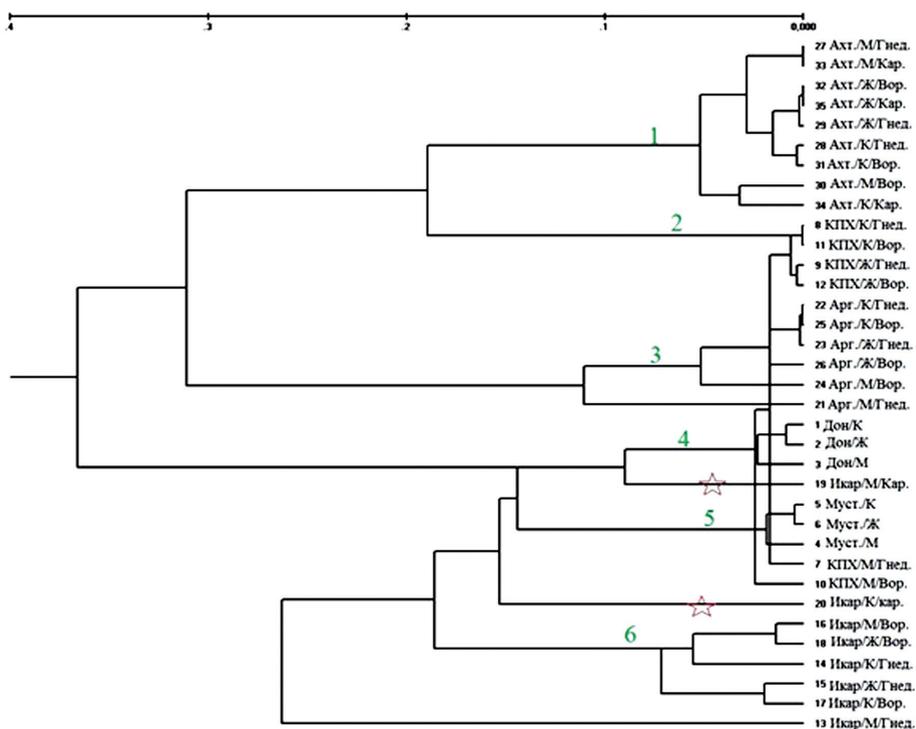
**Сравнительный анализ полиморфизма фрагментов ДНК по праймеру (AG)<sub>9</sub>C в хозяйствах «Ахтамас», «Аргомак», «Карплемхоз», «Мустанг», «Дон» и «Икар»**

| П.О./Хоз.  | "Ахтамас" | "Аргомак" | "Икар" | "КПХ" | "Дон" | "Мустанг" |
|------------|-----------|-----------|--------|-------|-------|-----------|
| 1490-1460  | К         | К         | К      | К     | К     | К         |
| 1450-1400  | К         | К         | П      | К     | П     | К         |
| 1390-1360  | П         | К         | П      | К     | Н     | П         |
| 1240-1220  | К         | К         | П      | К     | Н     | П         |
| 1110-1060  | К         | К         | П      | К     | К     | К         |
| 990-960    | К         | К         | П      | К     | К     | К         |
| 940-910    | К         | П         | П      | К     | Н     | Н         |
| 900-870    | К         | П         | К      | К     | К     | К         |
| 820-790    | К         | К         | К      | К     | К     | К         |
| 780-760    | Н         | Н         | Н      | К     | П     | Н         |
| 750-720    | Н         | Н         | Н      | К     | Н     | К         |
| 670-660    | П         | П         | К      | П     | К     | К         |
| 580-560    | К         | П         | К      | К     | К     | К         |
| 460-440    | К         | П         | П      | К     | К     | П         |
| 400-380    | К         | К         | П      | К     | К     | К         |
| 15 локусов | 2         | 5         | 8      | 1     | 2     | 3         |

*Примечание.* «К» – консервативный участок ДНК по данному фрагменту; «П» – полиморфизм по данному фрагменту; «Н» – данный фрагмент ДНК отсутствует.

По праймеру (AG)<sub>9</sub>C консервативными являются фрагменты длиной в 1490–1460 и 820–790 пар оснований. Так же достаточно консервативными являются участки длиной в 900–870, 580–560 и 400–380, так как по ним полиморфизм наблюдается только в каком-то одном хозяйстве. Зоны в 780–760 и 750–720 пар оснований отсутствуют у лошадей практически из всех хозяйств, кроме «КПХ» и «Мустанг».

Построенная на основании сравнения частот встречаемости ампликонов разной длины в спектрах праймера (AG)<sub>9</sub>C дендрограмма (рис. 2) включает два основных кластера.



**Рис. 2.** Дендрограмма генетических взаимоотношений, построенных на основании генетических дистанций у лошадей карачаевской породы лошадей в шести различных хозяйствах по праймеру  $(AG)_6C$

Можно отметить, что на данной дендрограмме (рис.2) видна достаточно четкая кластеризация лошадей (всех возрастных групп) по хозяйствам. Выделение животных с карачаевской мастью может говорить об их более древнем происхождении.

В спектрах ампликонов праймера  $(GAG)_6C$  выделяются 12 фрагментов ДНК (табл. 5, 6). Наибольший полиморфизм спектров данного праймера выявлен в хозяйствах «Мустанг» и «Дон», а наименьший – в хозяйствах «Ахтамас», «Аргомак» и «КПХ».

Таблица 5

**Полиморфное информационное содержание (PIC) и доля полиморфных локусов (P) спектров продукции амплификации по праймеру  $(GAG)_6C$**

| Праймер $(GAG)_6C$ | «Ахтамас» | «Аргомак» | «Карплемхоз» | «Мустанг» | «Дон»  | «Икар» |
|--------------------|-----------|-----------|--------------|-----------|--------|--------|
| PIC                | 0,0986    | 0,0404    | 0,0012       | 0,1364    | 0,0616 | 0,1292 |
| P,%                | 8,3       | 8,3       | 8,3          | 25,0      | 25,0   | 16,6   |

**Сравнительный анализ полиморфизма фрагментов ДНК по праймеру (GAG)<sub>6</sub>C в хозяйствах «Ахтамас», «Аргомак», «Карплемхоз», «Мустанг», «Дон» и «Икар»**

| П.О./Хоз.         | "Ахтамас" | "Аргомак" | "Икар"   | "КПХ"    | "Дон"    | "Мустанг" |
|-------------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|
| 1500-1400         | Н         | Н         | Н        | Н        | К        | К         |
| 1350-1300         | К         | К         | К        | К        | П        | П         |
| 1250-1150         | К         | К         | К        | К        | К        | К         |
| 1110-1060         | К         | К         | П        | К        | Н        | Н         |
| 1050-1000         | П         | К         | К        | К        | Н        | Н         |
| 980-950           | К         | П         | П        | К        | П        | П         |
| 820-790           | К         | К         | К        | К        | К        | К         |
| 710-680           | К         | К         | К        | К        | К        | К         |
| 670-660           | Н         | Н         | Н        | П        | П        | П         |
| 650-640           | К         | К         | К        | К        | К        | К         |
| 460-440           | Н         | Н         | Н        | К        | К        | К         |
| 400-380           | К         | К         | К        | К        | К        | К         |
| <b>12 локусов</b> | <b>1</b>  | <b>1</b>  | <b>2</b> | <b>1</b> | <b>3</b> | <b>3</b>  |

*Примечание.* «К» – консервативный участок ДНК по данному фрагменту; «П» – полиморфизм по данному фрагменту; «Н» – данный фрагмент ДНК отсутствует.

По праймеру (GAG)<sub>6</sub>C консервативными являются участки в 1250–1150, 820–790, 710–680, 650–640 и 400–380 пар оснований. Наиболее полиморфным является locus длиной в 670–660 пар оснований, так как у лошадей в одних трех хозяйствах он отсутствует полностью, а в трех других – полиморфен. В целом по данному праймеру полиморфизм ниже, чем по праймерам (AG)<sub>9</sub>C и (GA)<sub>9</sub>C.

На дендрограмме, построенной на основании расчета индивидуальных генетических расстояний по частотам встречаемости ампликонов спектров праймера (GAG)<sub>6</sub>C (рис. 3), выделяется два крупных кластера, которые в свою очередь делятся на подкластеры (которым присвоены номера от 1–4).

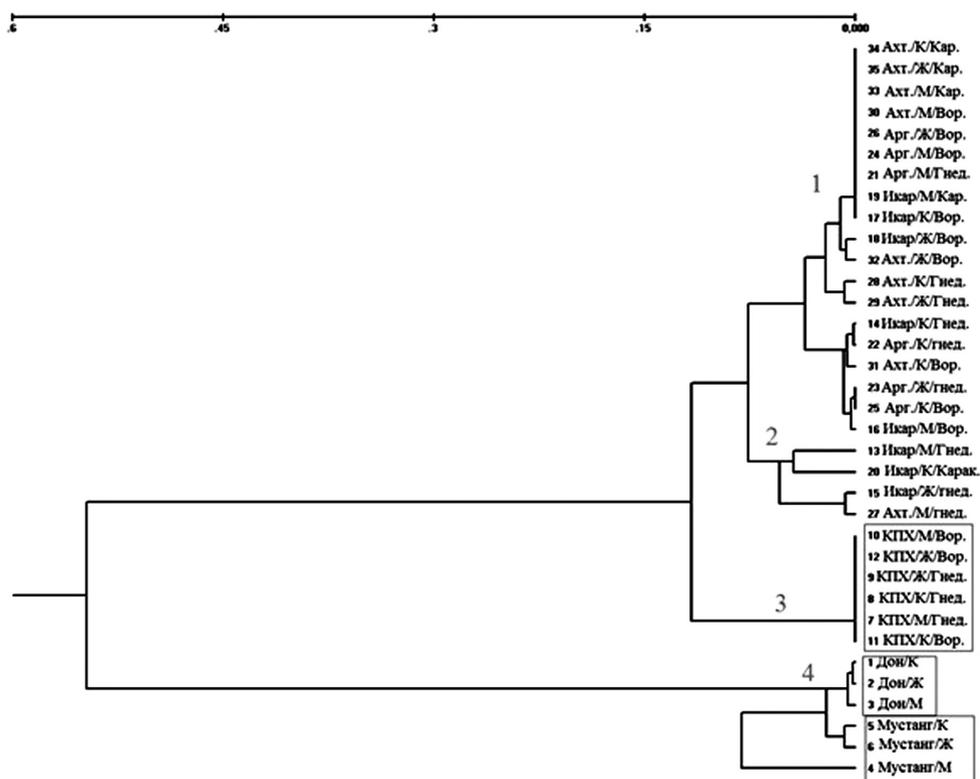
1 подкластер – включает в себя лошадей сразу из 3-х хозяйств: «Ахтамас», «Аргомак» и «Икар». Караковые животные хозяйства «Ахтамас» находятся наверху, затем идут жеребцы из «Ахтамаса» и «Аргомака». Стоит отметить, что непосредственно вместе находятся вороные жеребята «Икара» и «Ахтамаса».

2 подкластер – это все остальные лошади из хозяйства «Икар», а также гнедые жеребцы и ПР «Ахтамас».

3 подкластер – состоит исключительно из лошадей хозяйства «Карплемхоз».

4 подкластер – включает в себя 2 небольшие группы, отдельно лошади «Дона» и отдельно лошади Конезавода «Мустанг».

Вывод: в отличие от двух предыдущих праймеров, по праймеру (GAG)<sub>6</sub>C отсутствует четкая кластеризация по хозяйствам.



**Рис. 3.** Дендрограмма генетических взаимоотношений, построенных на основании генетических дистанций у лошадей карачаевской породы лошадей в шести различных хозяйствах по праймеру  $(GAG)_6C$

Все основные параметры спектров амплификации, полученные у лошадей карачаевской породы в шести различных хозяйствах, были усреднены и выведены в отдельную таблицу (табл. 7).

Таблица 7

**Основные параметры спектров амплификации, полученные у лошадей карачаевской породы из 6 различных хозяйств Карачаево-Черкесской Республики**

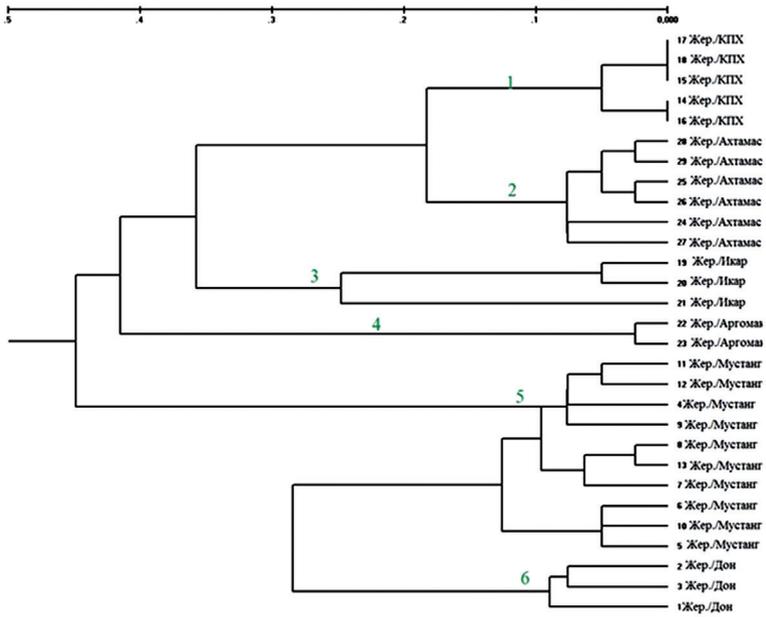
| Праймер                            | (AG) <sub>9</sub> C | (GA) <sub>9</sub> C | (GAG) <sub>6</sub> C | В сумме по трем праймерам |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------------|
| Количество локусов в спектре       | 15                  | 14                  | 12                   | 41                        |
| Границы длин анализируемых локусов | 380–1490            | 380–1450            | 380–1450             | 380–1490                  |
| РІС                                | 0,1118              | 0,1544              | 0,0779               | 0,1147                    |
| ДПЛ                                | 23,3                | 35,7                | 15,2                 | 24,7                      |

При анализе значений индекса PIC выяснилось, что суммарно у исследованных животных основной вклад в гетерозиготность вносят спектры продуктов амплификации, полученных при применении в ПЦР в качестве праймеров фрагментов микросателлитов  $(GA)_9C$  и  $(AG)_9C$  (табл. 7). На основании генотипирования 41 локуса можно сделать заключение о генетической дифференциации лошадей, воспроизводившихся в разных хозяйствах. По праймеру  $(GAG)_6C$  у исследованных лошадей найдено наименьшее количество полиморфных локусов (15,2%), по праймеру  $(AG)_9C$  – (23,3%), наибольшее значение было получено по праймеру  $(GA)_9C$  – (35,7%). Следует отметить, что праймеры, подобранные для проведения ПЦР представляют пурин/пиримидиновые треки, предрасположенные к формированию не только таких вторичных структур ДНК, как петли, но и триплексы, а в случае последовательности  $(GAG)_6C$  – еще и G4 квадроуплексы. Можно ожидать, что именно потенциальная предрасположенность последовательности  $(GAG)_6C$  к формированию более сложного спектра вторичных структур ДНК по сравнению с последовательностями  $(GA)_9C$  и  $(AG)_9C$ , вносит свой вклад в относительно пониженный полиморфизм фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированным повтором  $(GAG)_6C$ .

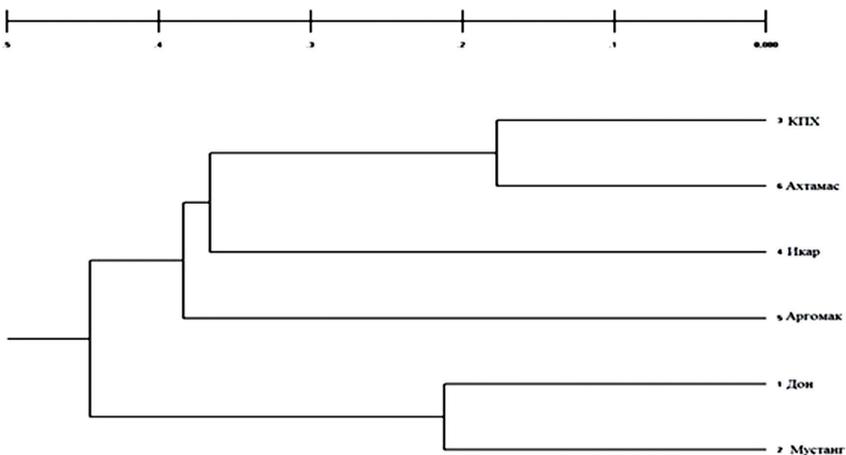
Необходимо отметить, что жеребцы-производители кластеризуются отдельно, что соответствует относительно большей интенсивности селекционной работы с ними по сравнению с кобылами.

Таким образом, выполненный анализ свидетельствует о высокой эффективности использования ISSR-PCR маркеров для оценки консолидированности групп лошадей с использованием в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции участков микросателлитов с коровым мотивом AG, GA и GAG. Подбор молекулярно-генетических маркеров для полилокусного генотипирования (геномного сканирования) может отличаться в зависимости от цели исследования. Для контроля происхождения и консолидированности пород и внутривидовых групп более эффективным будет применение ISSR-PCR маркеров [12].

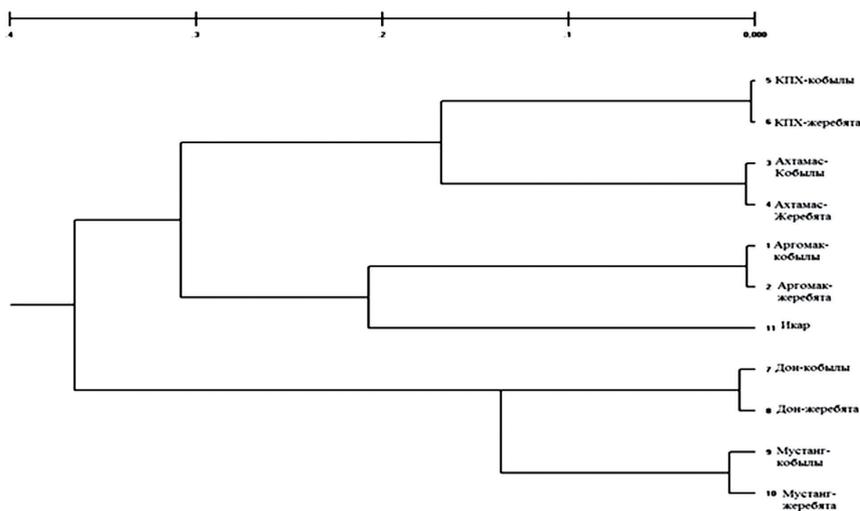
Все животные были распределены на группы не только по принадлежности к хозяйству, но и по половозрастным признакам. Исходя из этого, была построена общая дендрограмма (суммарно по всем 3 праймерам) для жеребцов-производителей из разных хозяйств (рис. 4, 5). На ней видно, как они четко кластеризуются по своим хозяйствам. При сравнении близости расположения жеребцов на дендрограмме и географическом расположении хозяйств, где они содержатся, отмечается определенное совпадение, что позволяет предположить обмен производителями или близкими родственниками между близко расположенными хозяйствами. То же наблюдается и на дендрограмме кобыл с кобылками (рис. 6). Кластеризация годовалых кобылок с кобылами свидетельствует об отсутствии существенных ошибок в оценках их происхождения.



**Рис. 4.** Индивидуальная дендрограмма генетических взаимоотношений, построенных на основании генетических дистанций у жеребцов производителей карачаевской породы лошадей из шести различных хозяйств суммарно по праймерам  $(AG)_9C$ ,  $(GA)_9C$  и  $(GAG)_6C$



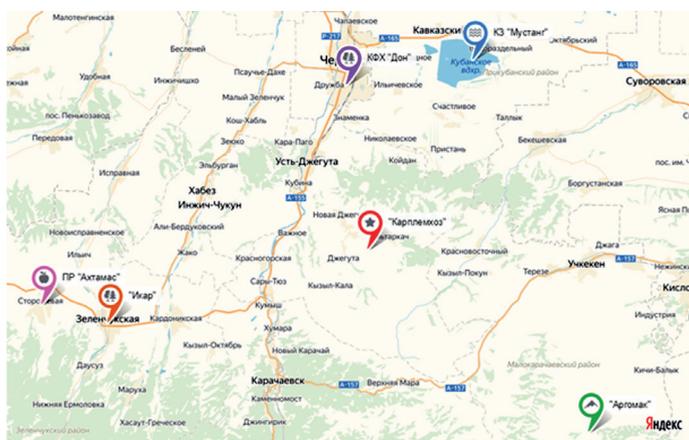
**Рис. 5.** Групповая дендрограмма генетических взаимоотношений, построенных на основании генетических дистанций у жеребцов производителей карачаевской породы лошадей из шести различных хозяйств суммарно по праймерам  $(AG)_9C$ ,  $(GA)_9C$  и  $(GAG)_6C$



**Рис. 6.** Дендрограмма по 3 праймерам ((AG)<sub>9</sub>C, (GA)<sub>9</sub>C, (GAG)<sub>6</sub>C), суммарно по 41 локусу – материнских кобыл с дочерними кобылками

Полиморфизм спектров ISSR-PCR маркеров значительно отличается в зависимости от использованных в качестве праймеров микросателлитов. Исходя из этого, наименьший полиморфизм спектров выявлен у праймера (GAG)<sub>6</sub>C – 15,2%, а наибольший по праймеру (GA)<sub>9</sub>C – 35,7%.

Чтобы наиболее точно оценить хозяйства, было учтено их географическое положение в Карачаево-Черкесской Республике и высота над уровнем моря (рис. 7). На данной карте видно, что все хозяйства равноудалены друг от друга. Достаточно близко расположены друг к другу хозяйства «Мустанг» и «Дон», а также «Ахтамас» и «Икар». Самое высокогорное хозяйство это «Аргомак» – 1800 м над у.м., а самое равнинное «Карплемхоз» – 622 м над у.м.



**Рис. 7.** Географическое положение хозяйств «Ахтамас», «Аргомак», «Икар», «Карплемхоз», «Мустанг» и «Дон»

На основании генотипирования 41 локуса можно сделать заключение о существенной генетической дифференциации карачаевских лошадей, воспроизводившихся в разных хозяйствах. Обращают на себя внимание популяционно-генетические отличия животных разных хозяйств, зависящие от селекционной работы, ведущейся в данных хозяйствах. Хозяйства ООО «Икар» и ООО «Аргомак», в отличие от других, не имеют статуса ПР (Племрепродуктора) или ПХ (племенного хозяйства), что говорит о том, что в данных хозяйствах содержатся лошади для хозяйственных и коммерческих целей (прокат, конный туризм, хозяйственные нужды и т.д.).

### Заключение

Генотипирование по микросателлитным локусам получило достаточно широкое распространение в популяционной генетике, особенно при решении таких актуальных задач, как контроль генетической структуры с.-х. видов и выявление породоспецифичных особенностей их генофондов. Выполненное исследование позволило оценить консолидированность и внутривидовые взаимосвязи карачаевской породы лошадей на примере шести хозяйств. Такие исследования могут позволить в дальнейшем выявить особенности популяционно-генетической структуры породы и подойти к описанию «генофондного стандарта» породы, что будет способствовать сохранению и совершенствованию карачаевской породы лошадей.

### Библиографический список

1. Бардуков Н.В., Феофилов А.В., Глазко Т.Т., Глазко В.И. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геноме домашней лошади *Equus caballus* // Сельскохозяйственная биология, 2014. № 4. С. 42–57.
2. Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К., Костюнина О.В., Быкова А.С., Банникова А.Д., Кудина Е.П., Брем Г. Молекулярные методы в диагностике заболеваний и наследственных дефектов сельскохозяйственных животных // Зоотехния, 2009. Вып. 8. С. 26–27.
3. Глазко В.И., Гладырь Е.А., Феофилов А.В., Бардуков Н.В., Глазко Т.Т. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геномах сельскохозяйственных видов млекопитающих // Сельскохозяйственная биология, 2013. Т. 2. С. 71–76.
4. Калашиников В.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М., Зайцева М.А., Калинкова Л.В. Полиморфизм микросателлитной ДНК у лошадей заводских и локальных пород // Сельскохозяйственная биология, 2011. № 2. С. 41–45.
5. Надеева Н.С., Харитонов С.Н. Особенности аллелофонда местных пород лошадей // Коневодство и конный спорт. 2008. № 3. С. 9.
6. Ольховская Л.В., Криворучко С.В., Целовальникова М.И. Выявление степени генетического родства карачаевской, тувинской и арабской пород лошадей // РВЖ СХЖ. 2011. № 1. С. 19.
7. Парфенов В., Политова М. Легенда Карачая // Конный мир, 2005. № 1.
8. Храброва Л.А. Теоретические и практические аспекты генетического мониторинга в коневодстве. Автореф. дисс. д. с.-х. н. 2011. Дивово, ГНУ ВНИИ коневодства, 26 с.
9. Храброва Л.А. Оценка гомозиготности лошадей с разным уровнем инбридинга по локусам микросателлитов ДНК // Зоотехния. 2010. № 9. С. 2–3.
10. Храброва Л.А., Блохина Н.В. Руководство по использованию микросателлитов ДНК при генотипической оценке лошадей. Дивово, 2012. 20 с.
11. Храброва Л.А., Зайцева М.А., Калинкова Л.В. Генетическая дифференциация

чистокровных пород лошадей по микросателлитным локусам // Сельскохозяйственная биология. Серия: Биология растений. Серия: Биология животных. 2008. № 2. С. 31–34.

12. Эркенов Т.А., Елькина М.А., Юлдашбаев Ю.А., Глазко В.И. Полиморфизм мобильных генетических элементов в геномах домашней лошади // Известия ТСХА. М.: Изд-во РГАУ-МСХА. 2015. Вып. 3. С. 75–86.

13. Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism // Am. J. Hum. Genet., 1980. Vol. 32. P. 314–331.

14. Nei M. Genetic distance between populations, Amer. Naturalist, 1972. Vol. 106. No. 949. P. 283–2927.

15. Tellam R.L., Worley K.C. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution // Science. 2009. Vol. 324. P. 522–528.

16. FAO, 2015 – The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture Organization of the United Nations / Rome, 2015.

17. FAO, 2007 – The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome, 2007. 540 p.

18. Toth G. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. // Genome Research. 2000. Vol.10. P. 417–432.

19. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification, Genomics, 1994. V. 20. P. 176–183.

## SPECTRA OF ISSR-PCR MARKERS IN THE EVALUATION OF POPULATION-GENETIC DIFFERENTIATION OF THE KARACHAI HORSE ON FARMS OF THE KARACHAI-CHERKES REPUBLIC

T.V. GOLIK, T.F. ERKENOV, T.T. GLAZKO, V.I. GLAZKO

(Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy)

*According to the FAO, at present, issues related to the conservation of genetic resources of farm-purpose local breeds, their genetic and phenotypic diversity, are becoming especially topical. Local breeds are interesting because they carry in their genome alleles and their combinations associated with the possibility of adaptation to specific environmental conditions. In the present paper, the authors analyze the genotypes of Karachai horses from six different farms of the Karachai-Cherkess Republic at 41 loci, using methods of genotyping the products of amplification of genomic DNA fragments of horses flanked by inverted repetitions of segments of  $(AG)_9C$ ,  $(GA)_9C$  and  $(GAG)_6C$  microsatellite loci  $(AG)_6C$  using the polymerase chain reaction (Inter-Simple Sequence Repeats - ISSR-PCR markers). Basing on the genotyping of 376 horses at 41 loci, it is possible to draw a conclusion about genetic differentiation of horses reproduced on different farms. The lowest number of polymorphic loci (16.6%) has been observed in  $(GAG)_6C$  spectra, the primer  $(AG)_9C$  - (23.3%), the highest value has been obtained by the primer  $(GA)_9C$  - (35.7%). The data obtained indicate a sufficiently high degree of consolidation of the studied group of animals. Relatively increased polymorphism is characteristic of the spectra of amplification products in horses from the Ikar farm, while the animals from the Karplemkhoz farm have proved to be the most consolidated.*

**Key words:** the Karachai breed of horses, spectra of amplification products, genetic differentiation, ISSR-PCR markers, consolidation.

## References

1. *Bardukov N.V., Feofilov A.V., Glazko T.T., Glazko V.I.* ISSR-PCR markery i mobil'nyye geneticheskiye elementy v genome domashney loshadi *Equus caballus* [VI ISSR-PCR markers and mobile genetic elements in the genome of a domestic horse *Equus caballus*] // *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*, 2014. No. 4. Pp. 42–57.
2. *Gladyr' Ye.A., Zinov'yeva N.A., Ernst L.K., Kostyunina O.V., Bykova A.S., Bannikova A.D., Kudina Ye.P., Brem G.* Molekulyarnyye metody v diagnostike zabolevaniy i nasledstvennykh defektov sel'skokhozyaystvennykh zhiivotnykh [Molecular methods in the diagnostics of diseases and hereditary defects of farm animals] // *Zootekhnika*, 2009. Issue 8. Pp. 26–27.
3. *Glazko V.I., Gladyr' Ye.A., Feofilov A.V., Bardukov N.V., Glazko T.T.* ISSR-PCR markery i mobil'nyye geneticheskiye elementy v genomakh sel'skokhozyaystvennykh vidov mlekopitayushchikh [ISSR-PCR markers and mobile genetic elements in the genomes of farm mammal species] // *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*, 2013. Vol. 2. Pp. 71–76.
4. *Kalashnikov V.V., Khrabrova L.A., Zaytsev A.M., Zaytseva M.A., Kalinkova L.V.* Polimorfizm mikrosatellitnoy DNK u loshadey zavodskikh i lokal'nykh porod [Polymorphism of microsatellite DNA in horses of commercial and local breeds] // *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*, 2011. No. 2. Pp. 41–45.
5. *Nadeyeva N.S., Kharitonov S.N.* Osobennosti allelofonda mestnykh porod loshadey [Features of the allele fund of local horse breeds] // *Konevodstvo i konnyy sport*. 2008. No. 3. P. 9.
6. *Ol'khovskaya L.V., Krivoruchko S.V., Tseloval'nikova M.I.* Vyyavleniye stepeni geneticheskogo rodstva karachayevskoy, tuvinskoy i arabskoy porod loshadey [Identification of the degree of genetic kinship of the Karachai, Tuvan and Arabian horse breeds] // *RVZh SKhZh*. 2011. No. 1. P. 19.
7. *Parfenov V., Politova M.* Legenda Karachaya [The legend of Karachay] // *Konnyy mir*, 2005. No. 1.
8. *Khrabrova L.A.* Teoreticheskiye i prakticheskiye aspekty geneticheskogo monitoringa v konevodstve. Avtoref. diss.. d. s.-kh. n. [Theoretical and practical aspects of genetic monitoring in horse breeding. Self-review of DSc (Ag) thesis]. 2011. Divovo, GNU VNII konevodstva, 26 p.
9. *Khrabrova L.A.* Otsenka gomozigotnosti loshadey s raznym urovnem inbridinga po lokusam mikrosatellitov DNK [Assessing the homozygosity of horses with different levels of inbreeding at the loci of microsatellite DNA] // *Zootekhnika*. 2010. No. 9. Pp. 2–3.
10. *Khrabrova L.A., Blokhina N.V.* Rukovodstvo po ispol'zovaniyu mikrosatellitov DNK pri genotipicheskoy otsenke loshadey [Manual on the use of DNA microsatellites in the genotypic assessment of horses]. Divovo, 2012. 20 p.
11. *Khrabrova L.A., Zaitseva M.A., Kalinkova L.V.* Geneticheskaya differentsiatsiya chistokrovnykh porod loshadey po mikrosatellitnym lokusam [Genetic differentiation of thoroughbred horses at microsatellite loci] // *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. Seriya: *Biologiya rasteniy*. Seriya: *Biologiya zhiivotnykh*. 2008. No. 2. Pp. 31–34.
12. *Erkenov T.A., Yel'kina M.A., Yuldashbayev Yu.A., Glazko V.I.* Polimorfizm mobil'nykh geneticheskikh elementov v genomakh domashney loshadi [Polymorphism of mobile genetic elements in the genomes of domestic horses] // *Izvestiya TSKhA. M.: Izd-vo RGAU-MSKhA*. 2015. Issue 3. Pp. 75–86.
13. *Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism // *Am. J. Hum. Genet.*, 1980. Vol. 32. Pp. 314–331.

14. *Nei M.* Genetic distance between populations, *Amer. Naturalist*, 1972. Vol. 106. No. 949. Pp. 283–2927.
15. *Tellam R.L., Worley K.C.* The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution // *Science*. 2009. Vol. 324. Pp. 522–528.
16. *FAO, 2015* – The Second Report on the State of the World’s Animal Genetic Resources for Food and Agriculture Organization of the United Nations / Rome, 2015.
17. *FAO, 2007* – The State of the World’s Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome, 2007. 540 p.
18. *Toth G.* Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. // *Genome Research*. 2000. Vol.10. Pp. 417–432.
19. *Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.* Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics*, 1994. Vol. 20. Pp. 176–183.

**Голик Татьяна Вадимовна** – мл. науч. сотр. Центра развития животноводства, межкафедрального учебно-научного центра биологии и животноводства, центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: golik.tikhon@mail.ru).

**Эркенов Тимур Алипович** – к. с.-н. н., руководитель Центра развития животноводства, межкафедрального учебно-научного центра биологии и животноводства, центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: ehr.timur@yandex.ru).

**Глазко Татьяна Теодоровна** – д. с.-х. н., проф. кафедры кормления и разведения животных РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: tglazko@rambler.ru).

**Глазко Валерий Иванович** – д. с.-х. н., проф., акад. РАН (иностраный член), лауреат премии Правительства России, профессор кафедры зоологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: vigvalery@gmail.com).

**Tatyana V. Golik** – Junior Research Associate, the Center for Livestock Breeding Development, the Inter-Departmental Educational and Scientific Center for Biology and Livestock, the Center for Nanobiotechnologies, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49, e-mail: golik.tikhon@mail.ru).

**Timur A. Erkenov** – PhD (Ag), Head of the Center for Livestock Breeding Development, the Inter-Departmental Educational and Scientific Center for Biology and Livestock, the Center for Nanobiotechnologies, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49, e-mail: ehr.timur@yandex.ru).

**Tatiana T. Glazko** – DSc (Ag), Professor, the Department of Feeding and Breeding of Farm Animals, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49, e-mail: tglazko@rambler.ru).

**Valery I. Glazko** – DSc (Ag), Professor, Academician of the Russian academy of Sciences (a foreign member), the Prize winner of the Russian Government, Professor, the Department of Zoology, , Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49, e-mail: vigvalery@gmail.com).