

УДК 636.3:636.082.12

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ МОНГОЛЬСКИХ ОВЕЦ, КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ЯКОВ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СТРЕССА

М.А. ЕЛЬКИНА, Е.Е. АСТАФЬЕВА, Т.В. КАРПУШКИНА, Т.Т. ГЛАЗКО,
Ю.А. СТОЛПОВСКИЙ*, В.И. ГЛАЗКО

(Центр нанобиотехнологий, кафедра разведения и племенного дела РГАУ - МСХА
имени КА. Тимирязева; * Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова)

Выполнен анализ внутривидовой генетической дифференциации с использованием ISSR-PCR-маркеров и микроядерного теста у монгольского скота (яков, крупного рогатого скота и овец), воспроизводящегося в условиях зоны рискованного животноводства Южного Гоби и в условиях биосферного заповедника Хубсугул. Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях зоны рискованного животноводства при хроническом воздействии стрессовых факторов окружающей среды формируется уникальный генофонд, специфика которого может быть идентифицирована с использованием случайной выборки ISSR-PCR-маркеров. Для животных всех трех видов, воспроизводимых в условиях Южного Гоби, судя по результатам микроядерного теста, характерна повышенная стабильность генетического аппарата.

Ключевые слова: ISSR-PCR, инвертированные повторы, экологический стресс, генетические расстояния, микроядерный тест.

Эколого-географические условия влияют на генетическую структуру популяций, тем самым являясь основным фактором внутри- и межвидовой дифференциации. Однако молекулярно-генетические механизмы таких процессов до сих пор остаются мало изученными. Использование ДНК-маркеров позволяет надежно контролировать происхождение животных, их консолидированность, изучать динамику генофондов. В настоящее время для этих целей применяется широкий спектр методов с использованием в качестве молекулярно-генетических маркеров полилокусных фрагментов ДНК, получаемых в полимеразной цепной реакции. В частности, к таким методам относится ISSR-PCR, где праймерами являются короткие участки микросателлитов.

Изменение генетической структуры популяций реализуется путем преимущественного размножения носителей определенных генотипов. У млекопитающих описана связь между нестабильностью генетического аппарата, выявляемой на основании частот встречаемости цитогенетических аномалий в клетках периферической крови, и снижением репродуктивной функции [1, 3, 5]. Одним из показателей такой нестабильности является частота встречаемости эритроцитов с микроядрами [3].

В настоящей работе выполнен сравнительный анализ популяционно-генетических структур монгольского скота (яков, крупного рогатого скота, овец) в условиях биосферного заповедника Хубсугул (Монголия) и в зоне рискованного животноводства пустыни Гоби в целях изучения видоспецифичности ответов на хроническое действие факторов экологического стресса. В качестве молекулярно-генетических маркеров использовали оценки полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным микросателлитным локусом (AG, ISSR-PCR-маркеры). Для того чтобы оценить влияние разных эколого-географических условий животноводства на стабильность генетического аппарата, выполняли подсчет эритроцитов с микроядрами в мазках периферической крови животных.

Материалы и методы

Исследовали популяции монгольского скота (крупный рогатый скот, яки, овцы), разводимые на территории Южного Гоби, и популяции этих же видов животных, обитающие в биосферном заповеднике Хубсугул. В качестве ДНК-маркеров рассматривали полиморфизм фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов (ISSR-PCR-маркеры [2, 6]). Предварительно перед постановкой полимеразной цепной реакции (PCR) из образцов периферической крови животных была выделена геномная ДНК с использованием коммерческого набора (Синтол, Россия). В качестве праймеров использовали микросателлитный локус (AG)₉C. Реакцию проводили на амплификаторе «Терцик, ДНК Технология» (Россия) с применением набора сухих реагентов (Изоген, Москва). Условия и стадии проведения ПЦР: первоначальная денатурация 95°C — 2 мин; денатурация 95°C — 30 с, отжиг 55°C — 30 с, синтез 72°C — 2 мин. Всего 33 цикла. Анализ результатов амплификации проводили методом электрофореза в 2%-м агарозном геле с применением в качестве маркера молекулярных масс ДНК GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, USA) для оценки длины продуктов PCR-амплификации. Визуализацию продуктов PCR-амплификации проводили под ультрафиолетовым излучением на трансиллюминаторе после окрашивания гелей бромистым этидием. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью стандартных компьютерных программ «Genepop».

Для подсчета эритроцитов с микроядрами у животных каплю периферической крови разводили физиологическим раствором (1:1) и на предметных стеклах готовили мазки. Мазки фиксировали метиловым спиртом и высушивали при комнатных условиях, затем окрашивали по методу Папенгейма с использованием растворов Май-Грюнвальда и Гимзы. Подсчитывали частоту эритроцитов с микроядрами (ЭМЯ) не менее чем в 3000 клетках, полученные данные выражали в промилях (в ‰). Для анализа клеток использовали бинокулярный микроскоп фирмы Motic со встроенным цифровым фотоаппаратом (DMBA300) при увеличении в 1000 раз. Статистическую достоверность различий частот встречаемости цитогенетических аномалий между группами животных оценивали по критерию Стьюдента (St).

Результаты и их обсуждение

Выполнен сравнительный анализ генетических структур групп яков, крупного рогатого скота, овец, воспроизводящихся в условиях биосферного заповедника Хубсугул и в зоне рискованного животноводства пустыни Южного Гоби путем анализа генотипов суммарно 38 локусов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлита с коровым мотивом AG (ISSR-PCR-маркеры). Генетическую

структуру популяций оценивали по доле полиморфных локусов, полиморфному информационному содержанию, а также путем расчета значений генетических расстояний по методу М. Нея (DN, [4]).

В результате получены следующие данные. Доля полиморфных локусов (P) у яков 15,8%, полиморфное информационное содержание (PIC) 0,039. В популяциях яков в пустыне Гоби — P 10,5%, PIC — 0,039; в заповеднике Хубсугул — P 13,2%, PIC — 0,040, генетическое расстояние между ними DN=0,0410. У монгольского крупного рогатого скота суммарно P 28,9%, PIC — 0,049, в пустыне Гоби — P 13,2%, PIC — 0,035; в заповеднике Хубсугул — P 23,7%, PIC — 0,067; генетическое расстояние между ними DN=0,1087. У монгольских овец суммарно P 42,1%, PIC — 0,095, в пустыне Гоби — P 34,2%, PIC — 0,118; в заповеднике Хубсугул — P 10,5%, PIC — 0,071; генетическое расстояние между ними DN=0,1712.

Нужно отметить, что генетическое расстояние между животными популяций Гоби одного вида и другим видом больше, чем генетическое расстояние между данным видом в целом и сравнимым (таблица), т.е. по отношению к другим популяциям животные популяции пустыни Гоби являются «маргинальными».

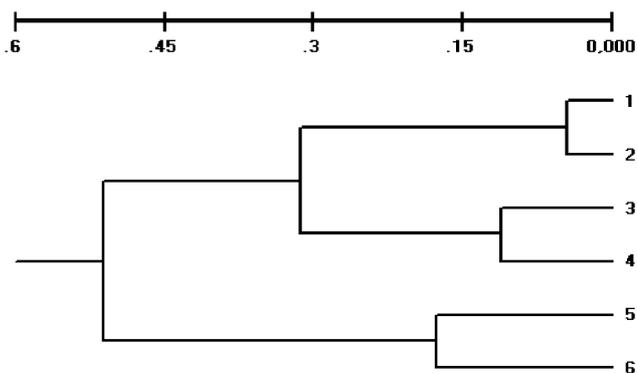
На дендрограмме, построенной по генетическим расстояниям (рисунок), яки образуют общий кластер с крупным рогатым скотом, обе группы овец — отдельный кластер. Полученные данные свидетельствуют о том, что популяционно-генетическая дифференциация по ISSR-PCR-маркерам наиболее глубока у овец, наименее — у яков, что согласуется с характеристиками полиморфизма 38 локусов ISSR-PCR-маркеров у этих видов (P, PIC).

Генетические расстояния (DN, М. Нея, 1972) между группами яков, крупного рогатого скота и овец, воспроизводящихся в условиях зоны рискованного животноводства и биосферном заповеднике Хубсугул

| Животные | Яки Гоби | Яки Хубсугул | Крупный рогатый скот Гоби | Крупный рогатый скот Хубсугул | Овцы Гоби | Овцы Хубсугул |
|-------------------------------|----------|--------------|---------------------------|-------------------------------|-----------|---------------|
| Яки Гоби | — | | | | | |
| Яки Хубсугул | 0,0410 | — | | | | |
| Крупный рогатый скот Гоби | 0,3318 | 0,2759 | — | | | |
| Крупный рогатый скот Хубсугул | 0,3758 | 0,2528 | 0,1087 | — | | |
| Овцы Гоби | 0,5779 | 0,4351 | 0,6181 | 0,4829 | — | |
| Овцы Хубсугул | 0,4490 | 0,3472 | 0,6054 | 0,5418 | 0,1712 | — |

В районе Хубсугул частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами оказались существенно выше, чем у тех же видов в зоне рискованного животноводства. В районе Хубсугул у овец частота эритроцитов с микроядрами составляла $5,3 \pm 0,4\%$; у крупного рогатого скота — $4,6 \pm 0,7\%$; у яков — $3,2 \pm 0,6\%$; в пустыне Гоби у овец — $0,9 \pm 0,1\%$; у крупного рогатого скота — $1,8 \pm 0,6\%$; у яков — $0,3 \pm 0,2\%$, т.е. дифференциация животных по микроядерному тесту совпала с наблюдаемой по молекулярно-генетическим маркерам: наибольшая — у овец, наименьшая — у яков.

Частоты встречаемости эритроцитов с микроядрами у крупного рогатого скота и овец Хубсугула соответствуют типичным для ряда других пород этих видов в отличие от животных пустыни Гоби. Микроядерный тест в соматических клетках широко



Дендрограмма, построенная на основании генетических расстояний (DN, М.Ней, 1972), рассчитанных частотам встречаемости генотипов по 38 локусам (ISSR-PCR-маркеры) между группами животных, воспроизводимых в условиях зоны рискованного животноводства Южного Гоби (группы на рисунке указаны под цифрами: яки — 1, крупный рогатый скот — 3, овцы — 5) и в условиях биосферного заповедника Хубсугул (яки — 2, крупный рогатый скот — 4, овцы — 6)

дов. Так, между яками Гоби и обеими группами крупного рогатого скота DN — 0,3318, 0,3758, а между яками Хубсугула и этими же группами крупного рогатого скота — 0,2759, 0,2528 (см. таблицу).

В результате естественного отбора в условиях зоны рискованного животноводства, при хроническом воздействии стрессовых факторов окружающей среды, формируется уникальный генофонд популяций, специфика которого может быть идентифицирована с использованием случайной выборки ISSR-PCR-маркеров в совокупности с цитогенетическими методами. Среди исследованных нами животных особый интерес представляют собой овцы, чей геном обладает наибольшим количеством полиморфных локусов, а значит, наиболее мобилен и быстрее отвечает на изменения окружающей среды.

Библиографический список

1. *Х.Жигачева А.П., Эрнст Л.К., Богачев А.С.* О накоплении груза мутаций в породах крупного рогатого скота при интенсивных технологиях воспроизводства и улучшения по целевым признакам // *Сельскохозяйственная биология*, 2008. № 6. С. 25-32.
2. *Ельсукова И.А., Феофилов А.В., Глазко В.П., Юлдашбаев Ю.А.* Генетическая дифференциация суюндукского и бирликского внутривидовых типов эдильбаевской породы овец // *Известия ТСХА*, 2010. Вып. 6. С. 84-89.
3. *Migliore I., Colognato R., Naccarati A., Bergamaschi E.* Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study // *Mutagenesis*, 2006. Vol. 21. № 2. P. 149-152.
4. *Nei M.* Genetic distance between populations // *Amer. Natur.*, 1972. Vol. 106. № 4047. P.434-436.

5. Rubes J., Horinova Z., Gustavson I., Borkovec L., Urbcmova J. Somatic chromosome mutations and morphological abnormalities in sperms of boars //Hereditas, 1991. Vol. 115. P. 139-143.

6. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification//Genomics, 1994. 20. P. 176-183.

Рецензент — д. с.-х. н. Ю.А. Юлдашбаев

SUMMARY

The analysis of intraspecific differentiation by means of both ISSR-PCR markers and micro-nuclear test in Mongolian farm animals (yaks, cattle, sheep) reproducing under conditions of risky animal fanning area (Southern Gobi) and under conditions of biosphere reserve Hubsugul has been carried out. Obtained data testify that under conditions of risky animal fanning area, accompanied by ecological stress impact factors, unique gene pool is forming, whose specificity can be identified through ISSR-PCR markers. Animals, reproducing under conditions of South Gobi, are characterized by higher stability of genetic apparatus, judging by results of micro-nuclear test.

Key words. ISSR-PCR, inverted repeats, ecological stress, genetic distances, micro-nuclear test.

Елькина Мария Александровна — аспирант центра нанобиотехнологий РГАУ - МСХА имени К. А. Тимирязева;

Астафьева Екатерина Евгеньевна — стажёр кафедры разведения и племенного дела РГАУ - МСХА имени К. А. Тимирязева;

Карпушкина Татьяна Вячеславовна — ст. лаб. центра нанобиотехнологий РГАУ - МСХА имени К. А. Тимирязева;

Глазко Татьяна Теодоровна — д. с.-х. н. Тел. (499) 976-34-34.

Столповский Юрий Анатольевич — д. б. н.

Глазко Валерий Иванович — д. с.-х. н. Эл. почта: vglazko@yahoo.com