

УДК 636.082.12:639.111.67(470.1/.25)

ISSR-PCR И IRAP-PCR-МАРКЕРЫ В ОЦЕНКАХ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ РЕИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ОВЦЕБЫКОВ НА СЕВЕР РОССИИ

Н.В. БАРДУКОВ¹, Т.П. СИПКО², В.И. ГЛАЗКО¹

¹ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева;

² Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН)

Выполнен сравнительный анализ трех популяций овцебыков, обитающих в восточной Гренландии, на полуострове Таймыр и острове Врангеля по двум типам молекулярно-генетических маркеров — ISSR-PCR и IRAP-PCR. Популяции острова Врангеля и полуострова Таймыр реинтродуцированы на север России из восточно-гренландской популяции. Обнаружены отличия характеристик полиморфизма по ISSR-PCR и IRAP-PCR-маркерам: данные по ISSR-PCR соответствовали истории происхождения популяций, степени близкородственных скрещиваний, однако полиморфизм IRAP-PCR-маркеров оказался наибольшим у реинтродуцированных групп по сравнению с исходной популяцией. Обсуждается важность комплексного анализа генетической структуры популяций с использованием разных типов молекулярно-генетических маркеров.

Ключевые слова: овцебык, геномное сканирование, ISSR-PCR, IRAP, ретротранспозоны, инвертированные повторы, микросателлиты.

Сокращение биоразнообразия требует принципиально нового подхода к его сохранению. Один из успешных подходов — работы по ре интродукции млекопитающих в места их бывшего местообитания. Реинтродукции ряда видов копытных в подходящие для них места обитания приводят к необходимости контроля состояния их популяций, проведения работ по анализу их численности и направлений изменения их генофондов. На территории России овцебыки обитали вплоть до середины голоцена и, как полагают, вымерли в Центральной Сибири около 4-2 тыс. лет назад [1]. Для реинтродукции в 1974 и 1975 гг. на север России доставлено 50 животных с о. Банкс — Канадский Арктический архипелаг и с острова Нунивак (Аляска) в Беринговом море.

К началу 2000 г. популяция на Таймырском п-ве насчитывала более 3000 особей и около 850 особей зафиксировано на о. Врангеля [3]. На о. Врангеля были завезены 20 животных с о. Нунивак (США), из этой же исходной популяции на п-в Таймыр были заселены 20 овцебыков и еще 10 животных с о. Банкс (Канада). На остров Нунивак популяция завезена из восточной Гренландии. Популяция овцебыков о. Банкс была достаточно большой и гетерогенной. Исходная восточно-гренландская нативная популяция (о. Гренландия) была использована для сравнения.

В первые годы интродукции численность овцебыков сокращалась, и на Таймыре погибло 33,3% животных, на о-ве Врангеля — 50% [4]. Первый результативный

отел произошел на Таймыре в 1978-м, на о-ве Врангеля — в 1977 г., и рост популяции начинался с 10 и 20 особей соответственно. Первое десятилетие численность овцебыков увеличивалась медленно, а затем стала достаточно быстро расти. На о-ве Врангеля абсолютный рост числа овцебыков заметно отстал, что, вероятно всего, было вызвано меньшим числом основателей популяции, от которых к 1981 г. оставалось только пять особей. В последние годы рост врангелевской популяции овцебыков, вероятно, ограничивает недостаток пастбищ, что вызвано превышением числа овцебыков и других фитофагов над кормовой емкостью мест их обитания [5]. В целях контроля изменений генетической структуры реинтродуцированных овцебыков в настоящей работе с использованием оценок полиморфизма геномных полилокусных спектров ДНК, фланкированных различными инвертированными повторами, выполнены сравнения генофондов популяций реинтродуцированных овцебыков п-ва Таймыр и о. Врангеля; а также нативной популяции о. Гренландия.

Материалы и методы

Исследования проведены на геномной ДНК 80 овцебыков из трех вышеуказанных популяций. Для сравнительного анализа генетической структуры животных (оценка доли полиморфных локусов, полиморфного информационного содержания каждого локуса — Polymorphic Information Content, PIC) применяли методы ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeat) и IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism. [2]). По методу ISSR-PCR в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР или PCR) использовали фрагменты ди- и тринуклеотидных микросателлитов с якорными нуклеотидами [10].

В работе выполнялось также геномное генотипирование по группе IRAP-маркеров — фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами терминальных участков (LTR) транспозона двудольных культурных растений SIRE-1 (номер по каталогу AF053008) и ретротранспозон-подобных элементов R173 семейства повторов однодольных RawS5 [9]. Каждый продукт амплификации (ампликон) рассматривался как отдельный локус.

Необходимо отметить, что для предотвращения ошибок, связанных, например, с неточностью отжига праймеров, учитывали только устойчиво воспроизводимую, не менее чем в трех повторностях, часть спектра продуктов амплификации (ампликонов), содержащую относительно легкие фрагменты ДНК (от 1500 до 100 пар оснований — п.о.).

ISSR и IRAP-маркеры имеют доминантный характер проявления, поэтому значения индекса PIC (Polymorphic Information Content), определяющего долю гетерозиготных вариантов, вычислялись по формуле: $PIC = 2f(1 - f)$, где f — частота одного из двух аллелей. При этом f рассчитывали по формуле \sqrt{R} , где R — частота встречаемости вариантов, у которых отсутствовал фрагмент ДНК данной длины. Таким образом, величина R определяла долю гомозигот по «рецессивному» аллелю — отсутствию фрагмента ДНК определенной длины в спектрах продуктов амплификации.

При выделении ДНК использовали набор реагентов для выделения геномной ДНК из цельной крови ДНК-Экстран-1 (ЗАО «Синтол», Москва). Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Терцик («ДНК-технология», Россия) со следующими параметрами: первичная денатурация ($t = 94^{\circ}\text{C}$, 2 мин); денатурация ($t=94^{\circ}\text{C}$, 30с), отжиг ($t=55^{\circ}\text{C}$, 30с), элонгация ($t=72^{\circ}\text{C}$, 2 мин)—35 циклов; финальная элонгация ($t = 72^{\circ}\text{C}$, 10 мин). При анализе полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами терминальных участков ретротранспозонов,

в качестве праймеров в ПЦР использовали терминальную последовательность ретро-Транспозона LTR-SIRE-1—5'GCAGTTATGCAAGTGGGATCAGCA3' [6] и ретротранспозонподобной последовательности Paws5 — 5AACGAGGGGTTTCGAGGCC3' [9]. В качестве ISSR-PCR-маркеров использовали праймеры (AG)₉C, (GA)₉C, (GAG)₆C. Для постановки реакции применяли наборы ПЦР-ПВ (ЗАО «Синтол», Москва). Разделение ампликонов (продуктов ПЦР) происходило в 1,5%-м агарозном геле, окрашивание производилось бромистым этидием. Генетические дистанции по методу М. Нея (1972) [7] оценивались с помощью программы TFGA. Дендрограммы генетических взаимоотношений были построены с помощью той же программы.

Результаты и их обсуждение

Характеристики спектров продуктов амплификации фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами двух динуклеотидных и одного тринуклеотидного микросателлитов, а также двух терминальных участков ретротранспозонов представлены в таблицах 1-3.

Таблица 1

Основные параметры спектров продуктов амплификации

Праймер	Количество ампликонов в спектре	Границы длин ампликонов спектра, п.о.
(AG) ₉ C	12	320-1060
(GA) ₉ C	14	210-1180
(GAG) ₆ C	12	270-820
LTR-SIRE-1	12	190-560
Paws 5	7	200-480

Таблица 2

Доля полиморфных локусов в спектрах амплификации (%)

Праймер	Таймыр	Врангель	Гренландия	По всем
(AG) ₉ C	8,33	0,00	16,67	25,00
(GA) ₉ C	42,86	42,86	35,71	50,00
(GAG) ₆ C	16,67	8,33	16,67	25,00
LTR SIRE-1	41,67	41,67	8,33	50
Paws 5	14,29	14,29	0	14,29

Таблица 3

Полиморфное информационное содержание (PIC) спектров продуктов амплификации

Праймер	Таймыр	Врангель	Гренландия	По всем
(AG) ₉ C	0,04	0,00	0,07	0,07
(GA) ₉ C	0,13	0,14	0,16	0,18
(GAG) ₆ C	0,06	0,03	0,07	0,08
Праймер LTR-SIRE-1	0,18	0,18	0,04	0,18
Праймер Paws 5	0,05	0,07	0,00	0,06
По ISSR-праймаерам	0,08	0,06	0,10	0,11
По ретротранспозонам	0,13	0,14	0,02	0,13

Для каждой популяции по ISSR-маркерам были найдены уникальные локусы. По праймеру (GA)₉C у популяции с острова Врангеля по локусу длиной 730 п.о. не было отмечено полиморфизма, напротив, фрагменты длиной 210 п.о. встречались не у всех животных (PIC = 0,392), тогда как в остальных популяциях всегда отмечалось присутствие данного фрагмента.

Таймырская популяция отличалась наличием полиморфизма по локусу 530 п.о. праймера (AG)₉C (PIC = 0,438) и по локусу 270 п.о. праймера (GAG)₆C (PIC = 0,404). Возможно, эти локусы полиморфны у овцебыков с острова Банкс либо отсутствуют у этих животных.

У гренландских животных по праймеру (AG)₉C отмечен локус длиной 700 п.о. (PIC = 0,5), который не был найден у животных из других популяций. У овцебыков из этой популяции также был обнаружен полиморфизм по локусу длиной 890 п.о. праймера (AG)₉C (PIC = 0,307) и по локусу длиной 330 п.о. праймера (GAG)₆C (PIC = 0,307). По локусу 1180 п.о. праймера (GA)₉C не было найдено полиморфизма. Найдено существенное отличие по частотам встречаемости ампликонов локуса 780 п.о. праймера (GA)₉C. Этот локус отмечен у 54% животных гренландской популяции (PIC = 0,434), в то время как у таймырских и врангелевских овцебыков этот показатель составляет 5% (PIC = 0,052) и 7% (PIC = 0,070) соответственно.

Значения индекса PIC, определяющего долю гетерозиготных вариантов в популяции, представлены в таблице 3. Исходя из данных таблицы, можно сделать вывод, что по ISSR-маркерам наибольшим количеством гетерозиготных вариантов обладает нативная гренландская популяция (PIC = 0,10), затем следует таймырская популяция, образованная животными с островов Банкс и Нунивак (PIC = 0,08) и последняя — популяция на острове Врангеля. Важно подчеркнуть, что относительно пониженная гетерозиготность по ISSR-PCR-маркерам совпадает с результатами сравнительного анализа этих же трех популяций по полиморфизму микросателлитных локусов [3]. По пяти микросателлитным локусам, полиморфизм которых оценивался в данной работе, таймырская популяция отличалась от гренландской несколько сниженным уровнем гетерозиготности, а популяция о. Врангеля имела выраженный дефицит гетерозигот. Известно также, что рассчитанный по методу Кисловского коэффициент инбридинга у популяции о. Врангеля существенно выше, чем у двух других [4]. Таким образом, полученные данные и по микросателлитным локусам, и по ISSR-PCR-маркерам качественно совпадают и свидетельствуют о том, что с увеличением расчетного коэффициента инбридинга в реинтродуцированных популяциях овцебыка характеристики генетической гетерогенности снижаются относительно более нативной гренландской популяции.

При сравнительном анализе полиморфизма ДНК-фрагментов, фланжированных инвертированными повторами терминальных участков ретротранспозонов у этих трех популяций, получены следующие данные. Уникальных фрагментов, присутствующих у какой-либо одной из популяций по праймерам LTR-SIRE-1 и PawS 5, не выявлено, однако обнаруживаются существенные различия по частотам встречаемости некоторых из них. В популяции из восточной Гренландии по праймеру PawS 5 не было выявлено ни одного полиморфного локуса, а по праймеру LTR-SIRE-1 присутствовал всего один полиморфный локус длиной 210 п.о. В популяциях с острова Врангеля и полуострова Таймыр по праймеру PawS 5 был найден один полиморфный локус длиной 250 п.о., а по праймеру LTR-SIRE-1 полиморфизм отмечен по шести локусам: 210, 230, 320, 370, 480 и 510 п.о. Причем из локусов 480 и 510 п.о. у врангелевской популяции полиморфным оказался локус 510 п.о., а у таймырской — 480 п.о.

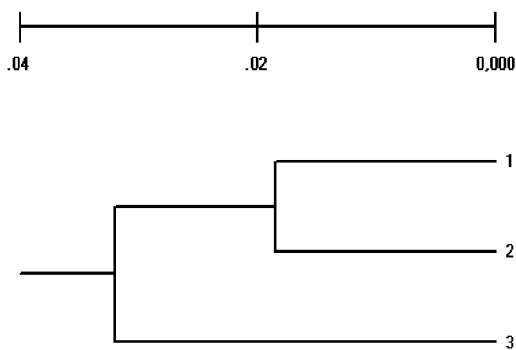


Рис. 1. Дендрограмма генетических взаимоотношений между популяциями, построенная по ISSR-маркерам: 1 — популяция полуострова Таймыр; 2 — популяция острова Врангеля; 3 — нативная популяция восточной Гренландии

Таблица 4
Величины генетических дистанций и индекса идентичности между популяциями овцебыков по ISSR-праймерам

Сравниваемая популяция	Генетическая дистанция	Идентичность
Таймыр / Врангель	0,0185	0,9817
Таймыр / Гренландия	0,0357	0,9649
Врангель / Гренландия	0,0284	0,9720

У нативной популяции из восточной Гренландии значения PIC и доли полиморфных локусов, рассчитанных по IRAP-маркерам, оказались наименьшими по обоим терминальным участкам ретротранспозонов. Наоборот, в наиболее инбредной популяции о. Врангеля доли полиморфных локусов и индекса PIC оказались наибольшими. Эта закономерность наблюдалась в спектрах продуктов амплификации, полученных с применением обоих праймеров, Paws 5 и LTR-SIRE-1, что увеличивает надежность выявленных закономерностей.

У нативной популяции из восточной Гренландии значения PIC и доли полиморфных локусов, рассчитанных по IRAP-маркерам, оказались наименьшими по обоим терминальным участкам ретротранспозонов. Наоборот, в наиболее инбредной популяции о. Врангеля доли полиморфных локусов и индекса PIC оказались наибольшими. Эта закономерность наблюдалась в спектрах продуктов амплификации, полученных с применением обоих праймеров, Paws 5 и LTR-SIRE-1, что увеличивает надежность выявленных закономерностей.

В спектрах праймера LTR-SIRE-1 у популяций п-ва Таймыр и о. Врангеля полиморфизм обнаруживается по фрагментам ДНК с длинами в 230, 320, 370, 480

Определенный интерес представляют отличия в генотипных характеристиках, полученных при использовании ISSR и IRAP-маркеров. Так, по значениям PIC, рассчитанным по ISSR-PCR-маркерам, так же как и по микросателлитным локусам, наименьшая гетерозиготность обнаруживается у популяции о. Врангеля (см. табл. 3), для которой характерно наименьшее значение коэффициента инбридинга [4]. Сравнительный анализ распределения аллельных вариантов по ISSR-маркерам согласуется с историей формирования реинтродуцированных популяций п-ва Таймыр и о. Врангеля, а также гренландской популяции, о чем наглядно свидетельствует дендрограмма (рис. 1), построенная на основании данных генетических расстояний по ISSR-PCR-маркерам между этими группами овцебыков (табл. 4). Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования рассмотренных ISSR-PCR-маркеров для объективной оценки популяционно-генетических параметров, истории происхождения групп животных, степени их сходства, а также сравнительного уровня инбридированности.

Популяционные характеристики, полученные с помощью IRAP-маркеров, качественно отличались от выявленных с помощью ISSR-маркеров, за исключением кластеризации популяций при построении дендрограмм генетических взаимоотношений (рис. 1, 2).

и 510 п.о.; по праймеру RawS 5 — по ДНК-фрагменту длиной в 250 п.о. По всем этим фрагментам отсутствует полиморфизм в гренландской популяции. Таймырская и врангелевская популяции отличаются тем, что по локусу длиной в 510 п.о. полиморфизм выявлен у животных о. Врангеля, а по локусу длиной в 480 п.о. — у таймырской группы животных.

Следует обратить внимание на то, что по праймерам LTR-SIRE-1 и RawS 5 было получено относительно много надежно воспроизводимых (при повторных анализах) продуктов амплификации (12 и 7 локусов соответственно). Этот факт может свидетельствовать о широкой распространенности фрагментов ДНК, комплементарных к терминальным участкам этих ретротранспозонов.

Нуклеотидная последовательность праймеров к терминальным участкам RawS 5 и LTR-SIRE-1 совершенно различна, однако наблюдается определенное сходство по длинам продуктов амплификации фрагментов ДНК, фланкированных их инвертированными повторами (рис. 3). Такое сходство полностью отсутствует в спектрах ампликонов, полученных с микросателлитными праймерами (AG)₉C и (GA)₉C, несмотря на то, что их последовательности отличаются только сдвигом в один нуклеотид.

Если рассмотреть распределение длин фрагментов ДНК, полученных с праймером LTR-SIRE-1, то обнаруживается определенная их «ступенчатая» закономерность (рис. 4). Если взять самый короткий фрагмент ДНК длиной в 145 п.о., то в спектре ампликонов выявляются 4 фрагмента ДНК, кратные ему по длине (длиной в 145, 290, 435 и 580 п.о.). Подобных закономерностей в спектрах (AG)₉C, (GA)₉C и (GAG)₆C праймеров не наблюдалось.

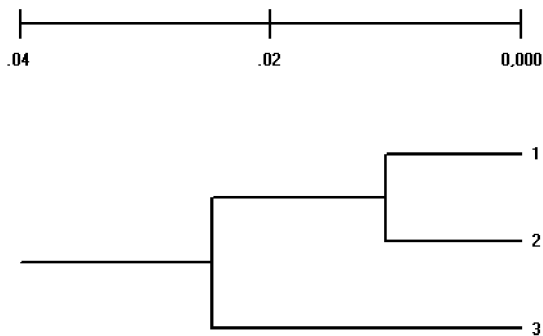


Рис. 2. Дендрограмма генетических взаимоотношений между популяциями, построенная по IRAP-маркерам: 1 — популяция полуострова Таймыр; 2 — популяция острова Врангеля; 3 — нативная популяция восточной Гренландии

Таблица 5
Величины генетических дистанций и индекса идентичности между популяциями овцебыков по IRAP-праймерам

Сравниваемая популяция	Генетическая дистанция	Идентичность
Таймыр / Врангель	0,0108	0,9893
Таймыр / Гренландия	0,0217	0,9785
Врангель / Гренландия	0,0276	0,9728

LTR-SIRE-1 PawS 5

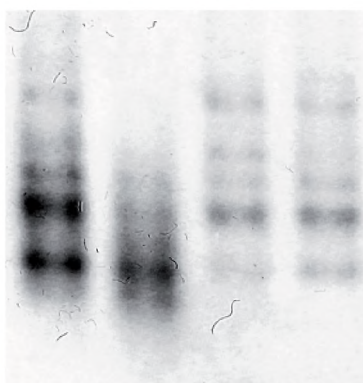


Рис. 3. Сходство спектров продуктов амплификации, полученных с применением в полимеразной цепной реакции, в качестве праймеров терминальных участков ретротранспозонов RawS 5 и LTR-SIRE-1 (IRAP-PCR-маркеры)

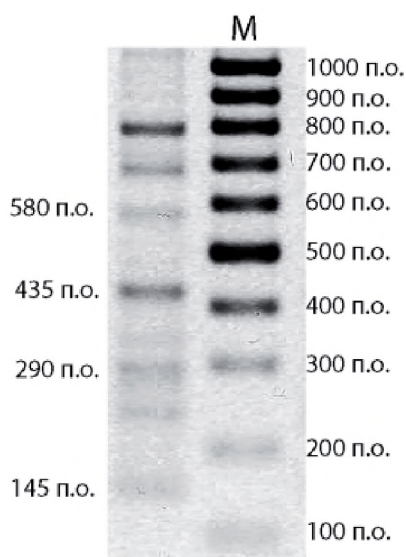


Рис. 4. «Ступенчатость» длин продуктов амплификации, полученных с использованием в качестве праймера терминального фрагмента LTR-SIRE-1: справа маркер молекулярных масс, слева указаны длины ампликонов спектра, пропорциональные 145 п.о.

петель вторичных структур ДНК. Однако полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что полиморфизм ISSR- и IRAP-маркеров отражают разные динамические процессы, происходящие в генофондах исследованных групп животных: в случае микросателлитных локусов — особенности происхождения, ретротранспозонов, по-видимому, эффекты экологических факторов.

Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют сделать следующее заключение. Полилокусное сканирование геномов может отражать разные процессы, идущие в генофондах животных, в зависимости от используемых ДНК-маркеров. Их подбор по структурно-функциональным особенностям позволяет получать комплексные данные о событиях, связанных с интродукцией животных в новые условия обитания, в случае ISSR-PCR-маркеров — отражающие особенности происхождения животных, IRAP-PCR — влияние экологических факторов.

Библиографический список

1. *Верещагин Н.К., Барышников Г.Ф.* Вымирание млекопитающих Северной Евразии в четвертичном периоде / Млекопитающие Северной Евразии в четвертичном периоде. Л: Зоологический институт АН СССР, 1985. С. 3-38.
2. *Глазко В.И., Цветков П.Л., Иванов А.Н.* Генетическая дифференциация сортов риса по IRAP-маркером // Известия ТСХА, 2006. Вып. 4. С. 155-159.

Можно ожидать, что в условиях реинтродукции животных в относительно новые экологические условия, при прохождении эффектов «бутылочного горлышка», происходит активация транспозиций мобильных генетических элементов [8]. Полученные данные свидетельствуют о том, что в такую изменчивость у исследованных групп животных в основном вовлекаются геномные последовательности, фланкированные инвертированными повторами терминальных фрагментов ретротранспозонов, но не участками микросателлитных локусов. По-видимому, это могло бы объяснить альтернативные отличия в полиморфизме полилокусных спектров ISSR-PCR- и IRAP-PCR-маркеров между реинтродуцированными группами овцебыков п-ва Таймыр и о. Врангеля и восточно-гренландской популяцией. Следует подчеркнуть, что несмотря на разнонаправленность оценок полиморфизма по ISSR-PCR- и IRAP-PCR-маркерам, в обоих случаях наибольшие значения генетических дистанций получены при сравнении гренландской популяции с врангелевской и таймырской (см. табл. 4).

По методу получения спектров ДНК-, ISSR- и IRAP-маркеры во многом одинаковы, в обоих случаях амплифицируются фрагменты ДНК, фланкированные инвертированными повторами, потенциально способными к образованию ДНК-

3. *Сипко Т.П., Гордеева Н.В., Груздев А.П.* Сравнение генетической структуры популяций овцебыка, реакклиматизированных на севере России: Межвед. сб. науч. и науч.-метод. Тр. Копытные в зоопарках и питомниках. М.: Московский зоопарк, 2005. С. 66-74.
4. *Сипко Т.П., Груздев А.П., Егоров С.С., Тихонов В.Г.* Анализ процесса интродукции овцебыка на севере Азии // Зоологический журнал, 2007. Т. 86. № 5. С. 620-627.
5. *Gruzdev A.R., Sipko T.P.* Productivity and demography of muskoxen on Wrangel Island // J. Rangifer Report, 2003. № 11. P. 30.
6. *Laien H.M., Majumdar A., Gaucher E.A.* SIRE-1, a copia/Ty1-like retroelement from soybean, encodes a retroviral envelope-like protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998. V 95. № 12. P. 6897-6902.
7. *Nei M.* Genetic distance between populations // American Naturalist, 1972. Vol. 106. № 949. P. 283-292.
8. *Oliver K.R., Greene W.K.* Mobile DNA and the TE-Thrust hypothesis: supporting evidence from the primates // Mobile DNA, 2011. V 2. № 8. P. 1-17.
9. *Rogowsky P.M., Shepherd K. W., Langridge P.* Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences // Genome, 1992. V. 35. № 4. P. 621-626.
10. *Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.* Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, 1994. Vol. 20. P. 176-183.

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

SUMMARY

The comparative analysis of musk-oxen three populations that are found in eastern Greenland, Taimyr peninsula and Wrangel island by two types of molecular-genetic markers — ISSR-PCR and IRAP-PCR — has been carried out. Populations of Wrangel island and Taimyr peninsula were reintroduced to the north of Russia from eastern Greenland population. Differences in polymorphism characteristics by ISSR-PCR and IRAP-PCR markers are found out: data on ISSR-PCR correspond to population origin history, inbreeding degree is revealed. However, polymorphism of IRAP-PCR markers proved to be the most considerable in reintroduced groups in comparison with initial population. Importance of population genetic structure complex analysis using various types of molecular-genetic markers is discussed in the article.

Key words: musk oxen, genomic scanning, ISSR-PCR, IRAP, retrotransposons, inverted repeats, microsatellites.

Бардуков Николай Владимирович — стажер центра нанобиотехнологий РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Эл. почта: bardukv_nikolajj@mail.ru

Сипко Тарас Петрович — к. б. н., в. н. с. Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. Эл. почта: sipko@mail.ru

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