

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА  
БЫЧЬИХ НА ПРИМЕРЕ *BOS TAURUS*, *BISON BON ASUS*  
И *BISON BISON*

В.И. ГЛАЗКО, Г.М. ЖЕЛОНКИНА, Т.П. СИПКО, А.В. КУШНИР, Т.Т. ГЛАЗКО

(Центр нанотехнологий РГАУ - МСХА имени КА. Тимирязева)

С использованием разных типов молекулярно-генетических маркеров полиморфизма участков ДНК (белки, анонимные последовательности ДНК) выполнен сравнительный анализ генетических структур групп зубров, бизонов и крупного рогатого скота. Обнаружены выраженные отличия оценок сходства между видами в зависимости от используемых маркеров. Наблюдается достаточно высокий средний уровень полиморфизма по исследованным маркерам у рассмотренных групп животных.

*Ключевые слова:* генетическая структура; электрофоретические варианты белков; ДНК-маркеры; фрагменты ДНК, фланкированные короткими инвертированными повторами.

Мы живем в период начала осознания человечеством глобального экологического кризиса. Уже получены первые экспериментальные свидетельства глобальных изменений растительного и животного видового состава биосферы, связанных с изменением климата. Скорость исчезновения видов под антропогенным влиянием приобрела размеры глобальной экологической катастрофы. Это затронуло и современное сельское хозяйство, которое переживает влияние двух качественно новых факторов — очевидное увеличение техногенного загрязнения, а также изменение традиций использования генофондов с.-х. видов растений и животных. Для того чтобы приблизиться к пониманию генетического своеобразия с.-х. видов животных, необходимо сравнить их с близкородственными дикими видами.

С этой целью в настоящей работе выполнен сравнительный анализ генетических структур трех видов, имеющих общего предка и принадлежащих к семейству бычьих (*Bovinae*), — серого украинского скота (*Bos taurus*),

зубра (*Bison bonasus*) и американского бизона (*Bison bison*). В качестве молекулярно генетических маркеров полиморфизма различных участков генома использовали оценки полиморфизма ряда структурных генов и фрагментов анонимной ДНК, фланкированных инвертированными повторами ряда микросателлитных локусов (ISSR-PCR). Сравнительный анализ полиморфизма повторов ДНК широко используется для оценки генетической дифференциации между различными таксонами [2, 5-8]. Предполагается, что полиморфизм повторов ДНК преимущественно «нейтрален» по отношению к событиям эволюционного ранга. Как правило, современные генетико-филогенетические исследования выполняются с использованием маркеров повторенной ДНК (мини-, микросателлитные локусы; RAPD-PCR, ISSR). В этой связи был проведен сравнительный анализ участия в генетической дифференциации полиморфизма различных типов молекулярно-генетических маркеров (белки, RAPD-PCR, ISSR-PCR)

## Материалы и методы

Материалом исследований служили образцы крови (эритроциты, плазма) животных двух групп серого украинского скота: экспериментального хозяйства «Черга» Алтайского края (n=30) и хозяйства «Маркеево» Херсонской обл. (n=34); американского бизона (n=10)\*, воспроизводимого в биосферном заповеднике «Аскания-Нова», а также зубров (n=40) Беловежской Пуши.

С использованием методов электрофоретического разделения белков в крахмальном и полиакриламидном гелях с последующим гистохимическим окрашиванием был проанализирован полиморфизм 30 генетико-биохимических систем [2]. Электрофоретический анализ белков плазмы крови проводили в 11%-м разделяющем полиакриламидном геле. Белковые фракции окрашивали 1%-м раствором красителя Кумасси прочный голубой G-250. Подсчитывали долю полиморфных локусов и ожидаемую среднюю гетерозиготность по стандартным формулам.

При анализе полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором случайной последовательности в 10 нуклеотидов (метод RAPD-PCR), использовали два праймера, первичная последовательность которых была представлена в работе [3]: UBC-85: 5'-GTGCTCGTGCTG-3' и UBC-126: 5'-CTTTCGTGCT-3'. Амплифицировались участки ДНК, заключенные между последовательностями, комплементарными прямому и инвертированному варианту каждого праймера.

При анализе полиморфизма фрагментов ДНК по методу ISSR-PCR в качестве праймеров использовали фрагменты разных микросателлитных локусов [8]. В результате амплифицировались участки ДНК, заключенные между инвертированными повторами

микросателлитных локусов. Рассмотрены спектры продуктов амплификации, полученных при использовании в качестве праймеров участков ДНК со следующими нуклеотидными последовательностями: (AGC)<sub>6</sub>G, (CTC)<sub>6</sub>C, (GA)<sub>9</sub>C и (AG)<sub>9</sub>C. Продукты амплификации идентифицировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в ультрафиолетовом свете. Рассматривались только те продукты амплификации, которые воспроизводились в 3—5 независимо повторенных PCR-процедурах с ДНК одних и тех же животных. Для определения размеров продуктов амплификации на каждом блоке с двух сторон использовали маркер молекулярных весов 100 п.о. DNA Ladder Gibco BRL.

## Результаты и их обсуждение

### *Анализ полиморфизма биохимических маркеров*

Серая украинская порода крупного рогатого скота вместе с другими родственными и сходными с ней породами, разводимыми в Южной Европе, Юго-Западной Азии и Северной Африке, как уже отмечалось выше, представляет древнейшую группу крупного рогатого скота, именуемую серым степным скотом. Это одна из наиболее древних пород, предположительно связывающих европейские породы крупного рогатого скота с дикими предковыми формами. Животным серой украинской породы свойственны такие качества, как исключительная приспособленность к местным условиям, крепость конституции, выносливость, высокая жизнеспособность, устойчивость к различным заболеваниям.

Скрининг биохимических систем плазмы и эритроцитов крови выявил у серой украинской породы генетический полиморфизм по 6 локусам:

\* Образцы крови и органов были предоставлены к.б.н. Н.И. Ясинецкой.

амилаза-I (AM-I), церулоплазмин (CP), рецептор к витамину D (GC), пурин-нуклеозидфосфорилаза (NP), трансферрин (TF) и посттрансферрин-2 (pTF-2). Наиболее полиморфным белком плазмы крови серого украинского скота является TF, в системе которого выявлено 5 аллелей: A, D1, D2, E и G. Если первые четыре аллеля типичны для европейских пород, то TF F характерен для пород зебу и отсутствует у большинства европейских пород [4]. Преобладающим является TF D2, наиболее редко встречается TF F. Ранее было высказано предположение, что эта породная группа сохранила в себе некоторые уникальные блоки генов, присущие предковой форме, и TF F может служить вероятным маркером таких генных комплексов. По локусу CP у серой украинской породы наблюдали три генотипа: AA, AB, BB, наиболее часто встречается аллель A. При электрофоретическом анализе выявлено также три генотипа AM-I: BB, BC, CC, наиболее распространен AM-I B. Частота встречаемости медленного варианта B в системе GC значительно превышает частоту более быстрого варианта. Противоположная тенденция наблюдалась по локусу pTF — аллельный вариант A был преобладающим. По локусу NP более высокая частота встречаемости характерна для варианта с низкой активностью — NP L. По эритроцитарным ферментам у серой украинской породы выявлен полиморфизм по фосфоглюкомутазе, маннозофосфатазиме, карбоангидразе и щелочной фосфатазе.

Беловежская линия зубров происходит от пяти зубров беловежского подвида (*Bison bonasus bonasus*). После второй мировой войны линия вторично прошла через «бутылочное горлышко», в результате чего только 21 особь далее участвовала в восстановлении популяции зубров. Для беловежских зубров расчетная степень инбридинга в среднем составляет 0,324. Для этой группы зубров описано появление

признаков вырождения (измельчение) и распространение различных заболеваний (бельмо, крипторхизм и пр.). По морфологическим признакам они уклоняются как от кавказско-беловежских, так и от зубров XIX века. [1]. Помимо этого, электрофоретические исследования зубров Беловежской пушчи (Польша) по 69 локусам, по данным 1994 г., показали низкую степень гетерозиготности животных, равную 1,2%, что почти в 3 раза ниже аналогичных показателей для этого стада, полученных в 1987 г.

В исследованной нами группе зубров полиморфизм выявлен по системам CP, AM-I, ME (малик энзим), ICD (изоцитратдегидрогеназа), PEP B (пептидаза B) и PGM (фосфоглюкомутаза). Локус TF был мономорфен и имел сходство с TF A крупного рогатого скота, отличаясь несколько большей подвижностью мажорного компонента. По локусу PGM у зубра выявлены два аллельных варианта, обозначены как F (быстро мигрирующий) и S (медленно мигрирующий), других аллелей не обнаружено. У исследованных нами животных быстрый вариант встречается с частотой 0,650.

В системе ICD у зубров преобладал более быстрый вариант по электрофоретической подвижности с частотой встречаемости 0,900. Доля гетерозигот по данному локусу составляла 2%. При анализе полиморфизма PEP B у исследованных животных на электрофореграмме наблюдали три фенотипа — FF, FS и SS, которые кодируются двумя кодоминантными аутосомными аллелями F и S. Быстрый вариант был преобладающим (0,850). Быстро мигрирующий вариант более часто встречался и в системе ME (0,650). По данному локусу гетерозиготным был 1% животных. Полиморфизм у зубров по локусу ME, как и по локусу PEP B, выявлен польскими исследователями у 35 беловежских зубров.

Таким образом, доля полиморфных локусов в выборке исследованных

зубров составила 17,13%, а средний уровень гетерозиготности (локус на особь) — 0,065, что несколько больше полученных ранее польскими исследователями оценок зубров беловежской линии, составивших 0,035. От пород крупного рогатого скота исследованная группа зубров отличалась полиморфизмом по локусам малик энзима, изоцитратдегидрогеназы и мономорфизмом — локусов трансферрина, посттрансферрина 2, рецептора к витамину D, пуриннуклеозидфосфорилазы, маннозофосфатизомеразы, карбоангидразы и щелочной фосфатазы.

Асканийское стадо бизонов существует с 1897 г. и за период до 1967 г., согласно данным В.Д. Треус (цит. по [1]), в зоопарк завезли 17 бизонов и получили 64 особи приплода. С 1967 по 1972 г. дополнительно завезено еще 12 особей, в т.ч. 4 самца и 8 самок. Сейчас в зоопарке Аскании-Нова содержится 36 особей бизона (8 самцов и 28 самок).

У американского бизона полиморфизм выявлен по локусам AM-I, CP, PGM, GPI, PcpB и DP-1 (диафораза-1). Трансферрин у бизонов, как и у зубров, был инвариантен и по электрофоретической подвижности сходен с TF A крупного рогатого скота. Фермент диафораза в гомогенатах сердца бизонов на фореграммах был представлен тремя зонами. В зоне, расположенной ближе к аноду (DP-1), идентифицировали три типа диафоразы с различной электрофоретической подвижностью (быстро мигрирующий — FF, медленно мигрирующий — SS, и тип FS, для которого характерно наличие двух зон). По данному локусу у бизонов преобладал медленный вариант с частотой встречаемости 0,600. Гетерозиготами были 40% животных.

Продукты другого полиморфного локуса — PGM на электрофореграмме также были представлены спектрами полос, предполагающими кодоминантную экспрессию. Преобладающим был быстрый вариант (0,650). Гетеро-

зиготы составляли 30% всей выборки. Внутривидовой полиморфизм по электрофоретической подвижности с преобладанием быстрых вариантов наблюдался также по локусам GPI (глюкозофосфатизомеразы) и CP. По локусу AM-I у бизона описаны A и B аллельные варианты. Уровень гетерозиготности по этому локусу составлял 30%. Частоты встречаемости двух аллельных вариантов — F и S в системе PEP B у бизона были одинаковыми, выявлен высокий уровень гетерозиготности (80%). Доля полиморфных локусов у бизонов составила 17,1, средняя гетерозиготность — 0,071.

От пород крупного рогатого скота исследованная группа бизонов отличалась полиморфизмом по локусу глюкозофосфатизомеразы, диафоразы-1 и мономорфизмом — локусов трансферрина, посттрансферрина 2, рецептора к витамину D, пуриннуклеозидфосфорилазы, маннозофосфатизомеразы, карбоангидразы и щелочной фосфатазы.

Таким образом, в общем, у пород крупного рогатого скота, зубров и бизонов из 30 исследованных выявлено 15 полиморфных генетико-биохимических систем. Полиморфизм 10 из них выявлен у крупного рогатого скота, шести — у зубров и шести — у бизонов. В выборки полиморфных систем у зубров и бизонов входили 4 разные системы — малик энзим, изоцитратдегидрогеназа (зубры), глюкозофосфатизомеразы и диафораза-1 (бизоны) и 4 общие — церулоплазмин, амилаза-I, пептидаза B и фосфоглюкомутаза. Полиморфизм последних четырех систем обнаруживался и у крупного рогатого скота. Шесть систем — трансферрин, посттрансферрин-2, рецептор к витамину D, пуриннуклеозидфосфорилаза, маннозофосфатизомеразы, карбоангидраза и щелочной фосфатазы были полиморфны только у крупного рогатого скота.

Относительно высокий уровень полиморфизма у изученных видов

позволяет предположить действие в исследуемых группах животных механизмов, поддерживающих изменчивость по биохимическим маркерам.

Нами также был проведен сравнительный анализ электрофоретической подвижности группы ферментов у зубров, бизонов и у серого украинского скота. Между этими видами было обнаружено сходство по подвижности зон активности ферментов пентозо-фосфатного шунта (глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа — G-6-PD, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа — 6-PGD), гликолиза (PGM, GPI), а также ICD (изоцитратдегидрогеназа), GOT (глутаматоксалацетаттрансаминаза) и PEP A (пептидаза A).

Наибольшие отличия выявлены по продуктам локуса малатдегидрогеназы (MDH) — у бизона на электрофореграммах зоны активности этого фермента отличались наибольшей электрофоретической подвижностью среди изученных видов.

#### *Анализ полиморфизма маркеров RAPD-PCR*

Размер ампликонов, вошедших в анализ при использовании маркера UBC-85 [3], находился в пределах 2,4~0,4 т.п.о. (тысяч пар оснований или kb — килобаз). Фрагменты длиной 0,5 и 0,6 kb были характерны только для зубра, фрагменты длиной 0,8 и 1,1 kb — только для крупного рогатого скота, 0,7 и 1,3 — для бизона. В общем, при использовании этого праймера у трех исследованных видов выявлено 14 ампликонов. Только 4 из них (длины 1,7; 1,8; 1,9; 2,0 kb) были общими для всех трех видов, три — для крупного рогатого скота и для бизонов (0,4; 1,5; 1,6 kb) и один — для крупного рогатого скота и для зубров (2,4 kb). Шесть ампликонов обнаружены в спектрах только у одного из исследованных видов (по 2 у каждого вида). Следует отметить определенное сходство дифференциации видов по полиморфизму белковых маркеров и

по присутствию ампликонов в спектре UBC-85.

При использовании праймера UBC-126 фрагменты длиной 0,5 и 1,8 kb встречались только у крупного рогатого скота, 0,7 kb — только у зубра. Из девяти ампликонов, выявленных у трех видов, только один (1,9 kb) был общим; для зубров и крупного рогатого скота — четыре (0,9; 1,0; 1,3; 1,4 kb), для бизонов и зубров — только один (2,3 kb). То есть, если суммарно по белковым маркерам зубры и бизоны оказывались более сходными друг с другом, то при использовании в качестве праймера одного декануклеотида (UBC-85) все три вида по спектру ампликонов дифференцировались примерно одинаково, при использовании другого праймера (UBC-126) крупный рогатый скот и зубры имели более сходный спектр ампликонов, чем зубры и бизоны.

#### *Анализ полиморфизма маркеров ISSR-PCR*

Анализ спектров продуктов амплификации участков между инвертированными повторами микросателлитных локусов [8] позволил выявить межвидовые различия и по этому типу молекулярно-генетических маркеров. На электрофореграммах продуктов амплификации идентифицировались 21 и 24 полосы для праймеров (GA)<sub>9</sub>C и (AG)<sub>9</sub>C соответственно. В общем, размер ампликонов, вошедших в анализ, находился в пределах 2~0,4 kb. Каждый продукт амплификации рассматривали как отдельный локус. У всех трех видов исследованных животных подсемейства Bovinae наблюдали общие продукты амплификации размером 1,0 и 1,6 kb при использовании праймера (AG)<sub>9</sub>C. При использовании в качестве праймера последовательности (AG)<sub>9</sub>C специфичными для крупного рогатого скота были фрагменты длиной 1,9 и 1,3 kb, для бизона — 2 kb, для зубра видоспецифичных маркеров не выявлено (обедненный спектр

ампликонов). При применении этого праймера — (AG)<sub>9</sub>C — наиболее широкий спектр ампликонов среди исследованных видов подсемейства бычьих принадлежал бизону (14 фрагментов длиной от 1,9 до 0,4 kb). Количество продуктов амплификации крупного рогатого скота и зубра было 9 и 4 соответственно. Все ампликоны, выявленные у зубра, были представлены в спектрах двух других видов.

Для другого динуклеотидного праймера с последовательностью (GA)<sub>9</sub>C наблюдалась несколько другая картина. Наиболее широкий спектр ампликонов был представлен у крупного рогатого скота (8 фрагментов с длинами от 1,9 до 0,5 kb). В спектре ампликонов (GA)<sub>9</sub>C продукт амплификации размером 1,2 kb выявлен только у крупного рогатого скота, а у остальных видов отсутствует. Фрагмент длиной около 2 kb выявлен только у бизона. У зубра и бизона оказалось равное количество амплифицированных, но различающихся по длине фрагментов. Для крупного рогатого скота и зубра наблюдались два общих ампликона — 1,6 и 0,5 kb. У крупного рогатого скота и бизона выявлен один общий ампликон длиной 1,5 kb. Для всех трех видов подсемейства бычьих общими являлись два ампликона с длинами в 1,0 и 0,6 kb.

По тринуклеотидным праймерам ((AGC)<sub>6</sub>G и (CTC)<sub>6</sub>C) у представителей серой украинской получены спектры продуктов амплификации, которые включали по 16 фрагментов ДНК с длинами в 2600-550 п.о. и 3200-500 п.о. соответственно. Причем в спектре, полученном при использовании в качестве праймера (AGC)<sub>6</sub>G, 4 фрагмента оказались полиморфными (отсутствовали у отдельных представителей породы), а в спектре продуктов второго праймера таких фрагментов было 15.

То есть, как и в случае анализа продуктов амплификации RAPD-PCR, оценка внутривидового, породного полиморфизма, так же как и межви-

довой дифференциации, существенно варьирует в зависимости от используемого праймера, от анализируемого ампликона определенной длины.

Очевидно, что высокий уровень полиморфизма маркеров RAPD-PCR, ISSR-PCR удобен и, по-видимому, незаменим при решении проблем генетической паспортизации отдельных животных внутри вида, но может приводить к определенным ошибкам при межвидовых сравнениях. Так, нами были выполнены сравнения генетических структур крупного рогатого скота, зубра и бизона по распределению продуктов амплификации, суммарно полученных при использовании праймеров (GA)<sub>9</sub>C и (AG)<sub>9</sub>C. Каждая зона была обозначена как один локус (в порядке увеличения их молекулярной массы). Ее присутствие обозначалось как аллельный вариант А этого локуса, отсутствие — как аллельный вариант В. При анализе генетических взаимоотношений между серой украинской породой, зубром и бизоном, более близким к крупному рогатому скоту, оказался зубр. Анализ же белкового полиморфизма однозначно свидетельствует о большей генетической близости между зубром и бизоном, чем между ними и крупным рогатым скотом, прежде всего в связи с присутствием у первых по отдельным локусам (например, трансферрину, пуриннуклеозидфосфорилазе) аллельных вариантов, отличающихся по электрофоретическим характеристикам от типичных для крупного рогатого скота.

То есть «анонимность» продуктов амплификации, высокий уровень их полиморфизма, качественно разные оценки межвидовых взаимоотношений, получаемые при использовании разных праймеров, не позволяют ожидать, что применение в генетико-таксономических исследованиях маркеров ДНК, основанных на повторенных нуклеотидных последовательностях, позволит решить традиционные вопросы о межвидовых взаимоотноше-

ниях, скоростях эволюции и т.д. более успешно, чем при анализе белкового полиморфизма. По-видимому, и в случае ДНК-маркеров, так же как и генетико-биохимических систем, необходима индивидуальная оценка информативности и эффективности использования отдельных маркеров для решения конкретных задач.

### Заключение

Различия в оценках генетической дифференциации между тремя видами — зубрами, бизонами и крупным ро-

гатым скотом — качественно варьируют от маркера к маркеру вне зависимости от их типа — определяются ли эти маркеры полиморфизмом ДНК-повторов, либо электрофоретическими вариантами белков. Необходимо отметить, что, судя по результатам выполненных исследований, в изученных группах животных видов Bovin ae, по-видимому, действуют механизмы, способствующие поддержанию генетического внутривидового разнообразия, несмотря на ограниченное количество родителей (зубр, бизон) и факторы искусственного отбора (породы крупного рогатого скота).

### Библиографический список

1. Руденко Ф.А., Семашко В.Ю., Сипко Т.П. Полорогие. М.: ООО «Издательство Астрель», 2003.
2. Харченко П.Н., Глазко В.И. ДНК-технологии в развитии агробиологии / под ред. член-корр. Б.Ф. Ванюшина. М.: Воскресенье, 2006.
3. Bailey E, Lear T.L. Comparison of thoroughbred and Arabian horses using RAPD markers // *Anim Genet.*, 1994. Vol. 25 Suppl 1. P. 05-108.
4. Baker C.M.A., Manwell C. «Fircely feral»: on the survival of domesticates without care from man // *Z. Tierzucht. Zucht. biol.*, 1981. Bd. 98. S. 241-257.
5. Caetano-Anolles G. MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis// *Plant Molecular Biology*, 1994. Vol. 25. P. 1011-1026.
6. Caetano-Anolles G. Scanning of nucleic acids by in vitro amplification: New developments and applications // *Nature Biotechnology*, 1996. Vol. 14. P. 1668-1674.
7. Toth G., Gaspari Z., Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis // *Genome Research*, 2000. Vol. 10. P. 417-432.
8. 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.С. Юлдашбаев

### SUMMARY

With the use of different types of molecular genetic markers of polymorphism of different DNA regions (proteins, anonymous sequences of DNA) the comparative analysis of genetic structures of groups of *Bos taurus*, *Bison bonasus* and *Bison bison* was carried out. The expressed differences of estimations of similarity between species, depending on used markers were found out. High average level of polymorphism on the investigated markers in the considered groups of animals was observed.

*Key words:* genetic structure; electrophoretic protein variants; DNA markers; DNA fragments, flanking by inverted short repeats.