УДК 636.127.1:636.082.12

ПРОФИЛИ ДНК-МАРКЕРОВ (ISSR-PCR) У ЛОШАДЕЙ РЫСИСТЫХ ПОРОД

Н.В. БАРДУКОВ, Г.К КОНОВАЛОВА, В.И. ГЛАЗКО

(Центр нанобиотехнологий РГАУ - МСХА имени КА. Тимирязева)

Выполнен сравнительный анализ полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов (ISSR-PCR-маркеров) у групп американских, русских, орловских и помесных рысаков. Среди исследованных спектров продуктов амплификации ДНК-геномных участков выделены наиболее вовлеченные в межгрупповую генетическую дифференциацию. Обсуждается эффективность использования ISSR-PCR-маркеров в контроле генофондной динамики в процессе селекционной работе с рысаками.

Ключевые слова: ISSR-PCR-маркеры, микросателлиты, инвертированные повторы, геномные профили, генетическая структура, рысаки, помеси.

Изучение своеобразия генетической структуры различных групп с.-х. видов животных, исследования механизмов появления специфических характеристик генофондов являются на сегодняшний день особенно актуальными, поскольку позволяют подойти не только к решению задач общей и частной популяционной генетики, но и к разработке методов управления генетической изменчивостью, коррекции структуры генофонда в желательном направлении. Одним из наиболее перспективных способов описания своеобразия популяционно-генетической структуры в настоящее время является использование молекулярно-генетических маркеров. Особую важность эти методы приобретают в коневодстве, поскольку оценка рабочих качеств лошадей, в частности рысаков, возможна только в более позднем возрасте. Кроме того, широкое использование в скрещиваниях улучшающих пород в селекционном процессе, направленном на увеличение резвости лошадей, делает особенно актуальной проблему контроля их генетической структуры. Так, в особом внимании нуждается генофонд орловского рысака, улучшенного во второй половине XX в. кровью чистокровной верховой и американской рысистой пород. Без оценки и анализа результатов уже проведенной работы и при широком пополнении племенного ядра орловской породы потомками англо-орловских и американо-орловских помесей возникает проблема утраты уникальных ценных качеств орловского рысака [1].

В настоящее время имеется множество методов, позволяющих выделять специфические генофондные особенности групп животных, к одним из которых относится метод оценки полиморфизма фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов (Inter-Simple Sequence Repeat —

ISSR), с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР, или PCR) [5]. ISSR-PCR-маркеры позволяют получать множественные спектры продуктов амплификации различных участков геномной ДНК (ампликоны). Каждый ампликон рассматривается как отдельный локус, отсутствие фрагмента ДНК в спектре ампликонов принимается как гомозигота по рецессивному аллелю, присутствие — как доминантный фенотип. Такие спектры позволяют сравнивать полиморфизм геномов по разным участкам и оценивать своеобразие генофондов групп животных, их гетерозиготность и генетические взаимоотношения с другими группами. Составление селекционной программы с учетом не только родословной, оценок животных по происхождению, фенотипических и физиологических показателей, но и полилокусных генотипов, а также значений генетического сходства может способствовать ускорению и увеличению эффективности селекционной работы.

Нужно учитывать и то, что внутри породы может наблюдаться низкое генетическое разнообразие. Это может быть связано с малым количеством основателей, множественностью близкородственных скрещиваний, в частности, длительным использованием самцов одних и тех же линий в качестве улучшателей при межпородных скрещиваниях. Но для того, чтобы контролировать генофондную динамику, необходим предварительный подбор комплекса ISSR-PCR-маркеров, наиболее информативных для решения перечисленных задач. В этих целях в настоящей работе выполнен анализ ISSR-PCR-маркеров у групп лошадей рысистых пород.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 48 лошадях рысистых пород (американские рысаки; русские рысаки; орловские рысаки; помеси — русские рысаки, улучшенные американскими рысаками). Для выделения ДНК использовался набор реагентов для выделения геномной ДНК из цельной крови ДНК-Экстран-1 (ЗАО «Синтол», Москва). Для определения полиморфизма ДНК использовались ISSR-PCR-маркеры. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе «Терцик, ДНК-технология» (Россия) со следующими параметрами: первичная денатурация (t = 94°C, 2 мин); денатурация (t = 94°C, 30 с), отжиг (t = 55°C, 30 с), элонгация (t = 72°C, 2 мин) — 30 циклов; финальная элонгация (t = 72 °C, 10 мин). Для постановки реакции применяли лиофилизованные ПЦР-наборы GenePak PCR core (ООО «Изоген», Москва) и 4 вида праймеров: (AG)9C, (GA)9C, (CTC)6C, (GAG)6C, являющихся фрагментами микросателлитных локусов. Разделение ПЦР-продуктов по молекулярной массе осуществлялось при помощи метода горизонтального электрофореза в 1,5%-м агарозном геле, далее производилось окрашивание ампликонов бромистым этидием и просвечивание геля под ультрафиолетовым излучением на трансиллюминаторе с целью выявления ампликонов. Для определения размеров ампликонов применялся маркер молекулярных масс 100 Ьр + 1.5 КЬ + 3 КЬ (12 фрагментов от 100 до 3000 bp) М 27 (СибЭнзим, Россия).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием стандартных компьютерных программ Structure v2.2.

Результаты и их обсуждение

Выполнено генотипирование 48 лошадей рысистых пород по спектрам продуктов амплификации (ISSR-PCR-маркеры), полученных при использовании в ПЦР в качестве праймеров четырех участков микросателлитов ((AG)9C, (GA)9C, (CTC)6C, (GAG)6C). Суммарно по всем спектрам про-

дуктов амплификации (ампликонов) всего выявлено 35 локусов, 25 из которых были полиморфны. В спектре праймера $(AG)_9C$ выявлено 9 фрагментов ДНК, $(GA)_9C$ — 8, $(GAG)_eC$ — 11 (табл. 1). Наименьшее количество ампликонов обнаружено в спектре праймера $(CTC)_вC$ — 7 ампликонов, из них 2 были полиморфны у жеребцов, 3 — у кобыл.

Таблица 1

Состав и полиморфизм спектров продуктов амплификации ДНК, фланкированных фрагментами инвертированных повторов микросателлитов (ISSR-PCR-маркеры), **у исследованных групп рысаков**

Праймер	Количество ампликонов в спектре	Границы длин локусов спектра, п.о.	Количество внутрипородных полиморфных локусов	
			в абс. выражении	в % от общего числа ампликонов
(AG)9C	9	1200-320	7	77,8
(GA)9C	8	1000-360	7	87,5
(GAG)6C	11	1400-180	8	72,7
(CTC)6C	7	1100-350	3	42,9

Выполнен расчет индекса PIC (полиморфное информационное содержание — Polymorphous Information Contents) по формуле расчета гетерозигот для диаллельных локусов, для которых PIC=2f(l-f), где f — частота рецессивного аллеля, которая рассчитывается как корень квадратный из частот рецессивных генотипов (доля животных, у которых фрагмент ДНК данной длины отсутствует в спектре ампликонов, полученных с данным праймером).

Индекс PIC 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. Полученные величины PIC для каждого локуса спектра усредняли по всем ампликонам спектров одного праймера и таким образом рассчитывали усредненную гетерозиготность спектра. 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 (GAG)6C (табл. 2).

Небольшое количество животных относительно «чистых» по своему

Таблица 2

Полиморфное информационное содержание спектров продуктов амплификации

Праймер	По всем животным	Помеси, русский рысак, улучшенный американским рысаком	Американский рысак	Русский рысак	Орловский рысак
Праймер (AG)9C (9 локусов)	0,251	0,229	0,111	0,180	0,248
Праймер (GA)9C (8 локусов)	0,352	0,343	0,272	0,239	0,125
Праймер (GAG)6C (11 локусов)	0,296	0,252	0,270	0,204	0,203
Праймер (CTC)6C (7 локусов)	0,156	0,156	0,120	0,161	0,059
В среднем по всем праймерам	0,264	0,245	0,193	0,196	0,159

происхождению не позволяет получить надежные данные о межпородной генетической дифференциации. Тем не менее следует отметить, что у американских рысаков заметно ниже полиморфизм спектра (AG)9C, а у орловских — спектра (GA)9C по сравнению с другими группами животных при относительно сходных значениях PIC по другим спектрам. Полученные данные позволяют предполагать, что именно в спектрах (AG)9C и (GA)9C могут быть основные отличия между генофондами орловских и американских рысаков.

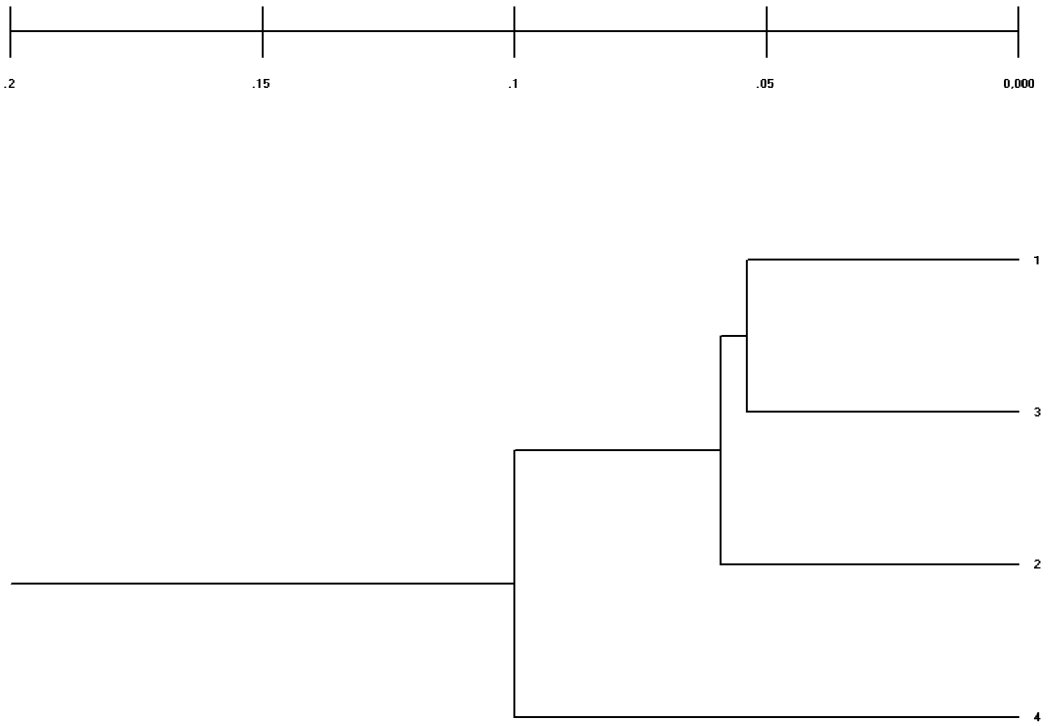
Известно, что русская рысистая порода является результатом длительной селекционной работы с потомством от скрещивания орловских кобыл и жеребцов американского рысака. Кроме того, сама орловская порода во второй половине XX в. неоднократно испытывала влияние американского рысака. Поэтому трудно было бы ожидать, что генофонды этих пород существенно отличаются друг от друга. Тем не менее, в наших предыдущих исследованиях были обнаружены выраженные отличия генофондов орловского и русского рысака по распределению аллельных вариантов по таким генетико-биохимическим системам, как трансферрин, фософглюкомутаза [2]. Обнаружены также отличия по количеству и распределению аллельных вариантов между этими породами по микросателлитным локусам HTG-10 и HTG-14 [3]. Следует отметить, что в наши предыдущие исследования входили достаточно большие выборки лошадей этих пород (русский рысак — 99 гол., орловский рысак — 102 гол., содержавшиеся в условиях киевского ипподрома и принадлежавшие различным конным заводам, большая часть — Дубровскому конному заводу Украины). Очевидно, что изменение направления селекционной работы с орловским рысаком от экстерьерных характеристик в сторону резвости может существенно влиять на генетическую структуру породы с учетом сниженных репродуктивных характеристик у животных с ярко выраженным экстерьерным типом орловской породы [4].

Тем не менее, использование 35 локусов ISSR-PCR-маркеров для расчета генетических расстояний, даже при таких небольших выборках, позволяет надежно дифференцировать группы животных в полном соответствии с историей формирования их генофондов (табл. 3, рисунок). По методу Нея (Nei 1972, 1978) были рассчитаны индекс идентичности и генетические расстояния между орловскими, русскими, американскими рысаками и помесями между русскими и американскими рысаками. Наименьшее генетическое расстояние оказалось

Таблица 3

Значения индекса идентичности и генетических расстояний, рассчитанных по методу М. Ней, между породами и помесями рысаков на основании распределения аллелей и генотипов по 35 локусам ISSR-PCR-маркеров

Группа животных	Несмещенные величины генетических расстояний М. Нея	Несмещенные величины индекса идентичности М. Нея
Помеси / рус. рысаки	0,0400	0,9607
Помеси / амер. рысаки	0,0456	0,9554
Помеси / орл. рысаки	0,0443	0,9566
Амер. рысаки / рус. рысаки	0,0394	0,9614
Амер. рысаки / орл. рысаки	0,1232	0,8841
Рус. рысаки / орл. рысаки	0,0652	0,9369



Дендрограмма генетических взаимоотношений, построенная на основании величин генетических дистанций, рассчитанных по распределению ISSR-PCR-маркеров у разных групп рысаков: 1 — помеси; 2 — американские рысаки; 3 — русские рысаки; 4 — орловские рысаки

между помесями и русскими рысаками, немного большее — между помесями и американскими рысаками, еще большее — между американскими и русскими рысаками, затем между помесями и орловцами, ощутимо большее — между орловскими и русскими рысаками и самое большое — между орловскими и американскими рысаками.

На основании величин генетических расстояний была построена дендрограмма, отражающая генетические взаимоотношения между исследованными группами животных (см. рисунок). Полученные данные свидетельствуют о том, что при таких сложных скрещиваниях и генофондных пересечениях в истории формирования групп исследованных животных использование полилокусных спектров ISSR-PCR-маркеров позволяет выявить генетическую дифференциацию даже между их малочисленными группами, отражающую особенности их происхождения. Можно ожидать также, что генотипирование спектров продуктов амплификации с использованием в качестве праймеров микросателлитов (AG)9C и (GA)9C может позволить достаточно надежно выявлять отличия между генофондами орловских и американских рысаков, а также контролировать их вклад в помесные группы животных.

Библиографический список

1. *Гаврова Ю.И.* Резвость и промеры орловских рысаков при скрещиваниях с лошадьми других быстроаллюрных пород: Автореф. канд. дисс. М., 2007.
2. *Амбросьева Е.Д., Хохрякова Ж.А., Глазко В.И.* Некоторые особенности генетической структуры орловской рысистой и русской рысистой пород лошадей // Цитология и генетика, 1992. Т. 26. № 5. С. 37-41.
3. *Глазко В.И., Облап Р.В., Кушнир А.В., Щирский О.Н.* Генетические маркеры лошадей // С.-х. биология. Сер. Биология животных, 1999. № 4. С. 38-47.
4. *Орлова Ю.А.* Влияние ярко выраженного типа породы на племенные качества орловского рысака: Автореф. канд. дисс. Дивово, 2008.
5. *Zietkiewicz E., Rafalski* ***A.,*** *Labuda D.* Genome fingerprinting by seguence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, 1994. 20. P. 176-183.

SUMMARY

The comparative analysis of polymorphism of DNA fragments, flanking by the inverted repeats of microsatellites (ISSR-PCR markers) in groups of American, Russian, Oryol and cross trotters was carried out. Among the investigated spectra of amplification products of genomic DNA the most involving between them in intergroup genetic differentiation were revealed. The efficiency of the ISSR-PCR marker using in control of gene poll dynamics in the process of selection work with trotters was discussed.

Key words: ISSR-PCR markers, microsatellites, invert repeats, genomic profiles, genetic structure, trotters, crosses.

Бардуков Николай Владимирович — стажер, Центр нанобиотехнологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева.

Коновалова Галина Константиновна — д. с.-х. н.

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