

А.В. ГОРОДНАЯ, В.И. ГЛАЗКО

Ин-т разведения и генетики животных УААН, с. Чубинское Киев. обл.,
Ин-т агрозоологии и биотехнологии УААН, Киев

ISSR-PCR В ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГЕНОФОНДОВ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА



С помощью метода ISSR-PCR исследована генетическая структура пяти пород крупного рогатого скота, разводимых на территории Украины. Выявлена породная специфичность спектров продуктов амплификации двух три-нуклеотидных праймеров, при использовании которых обнаружены продукты амплификации, отличающиеся у животных разного пола. Оценены возможности использования ISSR-PCR маркеров для характеристики генетических взаимоотношений между породами.

© А.В. ГОРОДНАЯ, В.И. ГЛАЗКО, 2002

Введение. В целях увеличения эффективности селекционной работы широко используются исследования генетической структуры пород сельскохозяйственных видов. Ранее наиболее распространенным для оценки генетической структуры пород был метод выявления полиморфизма структурных генов с использованием электрофоретического разделения белков. Но многие такие маркеры оказались мономорфными или имели низкий уровень полиморфизма [1]. В то же время для описания генофондов и их сравнений необходимы высокополиморфные маркерные системы. С этой целью в последнее время широко используют полиморфизм по количеству повторов в микросателлитных локусах [2–4]. Однако анализ полиморфизма микросателлитных локусов не всегда удобен в связи с тем, что требует подбора праймеров к флангам, а аллельные варианты отличаются на 2–3 нуклеотида. Одним из высокополиморфных типов маркеров являются анонимные последовательности ДНК, flankированные случайно выбранными декануклеотидами — RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) [5, 6]. Указанный метод позволяет получать высокополиморфные спектры, однако часто они характеризуются низкой воспроизводимостью в связи с большим количеством ошибок при отжиге. Метод ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeat) представляет развитие этих двух методов маркирования генофондов [7]. В качестве праймеров используют фрагменты нуклеотидной последовательности микросателлитных локусов ДНК (около 20 п.о.), на одном из флангов которых находятся «якорные» нуклеотиды. Получаемые спектры продуктов амплификации (ампликоны) полилокусны, и результаты хорошо воспроизводятся при повторном тестировании. ISSR-PCR методика позволяет по отсутствию-наличию ампликона в спектре оценивать полиморфизм локусов. Но до сих пор возможность использования данной методики для изучения генофондов пород и внутрипородных групп животных остается недостаточно исследованной.

Поэтому в задачи нашей работы входил сравнительный анализ (ISSR-PCR) спектров ампликонов, полученных в результате использования двух различных праймеров, при анализе генофондов пяти пород крупного рогатого скота.

Материалы и методы. Исследовали генетическую структуру представителей пяти пород крупного рогатого скота при помощи оценки

полиморфизма локусов анонимных последовательностей ДНК, flankированных инвертированными микросателлитными повторами. В работе использовали два тринуклеотидных праймера — 5'-(GAG)₆C-3' и 5'-(ACC)₆G-3'. Оценивали количество продуктов амплификации (ампликонов) в спектрах, долю полиморфных локусов спектра.

Группа животных серой украинской (СУ) породы (28 голов) взята для исследования в Херсонской области, Чаплинский р-н, с. Маркеево, заповедник «Аскания-Нова».

Животные белоголовой украинской (БУ) породы (11 голов) взяты из стада совхоза «Антонины» Хмельницкой области Красиловского района.

Лебединская порода (Л) представлена 16 животными, разводимыми в Сумской области (с. Штеповка Лебединского района), с которыми ведется улучшающая селекция путем прилития крови черно-пестрого скота и скота швицкой породы.

Исследованы 13 животных красной степной породы (КС), характерные для степной зоны юга Украины (с. Оситняжка Кировоградской области).

12 животных черно-пестрых голштино-фризов (Г-ФД) представлены линиями импортных быков голштинской породы, содержащихся в хозяйствах Днепропетровской области (Эрастовская опытная станция).

Исследовались 14 животных голштино-фризской породы (Г-ФН), содержащихся в хозяйстве «Новошепеличи» в 10-км зоне ЧАЭС. Животные в настоящий период составляют опытное стадо, и селекционная работа с ними не ведется (в качестве производителя использовался один бык Уран).

Кровь брали из яремной вены. В качестве консерванта использовали гепарин в расчете 25 МЕ на 1 мл крови. Пробы крови сохраняли на холоде (не замораживая) и разделяли на фракции.

Геномную ДНК из лимфоцитов периферической крови КРС выделяли по следующей методике. К 100 мкл лейкоцитарной фракции крови добавляли 1 мл десорбированной H₂O и подвергали образец замораживанию-оттаиванию. Затем проводили центрифугирование при 7000 об/мин, 5 мин в центрифуге типа Eppendorf. Супернатант сливал. Повторяли процедуру до тех пор, пока осадок не становился бесцветным. После этого осадок суспендировали в 400 мкл раствора, содержащего 25ММ ЭДТА, pH 8,0 и

75 мМ NaCl, затем добавляли SDS до 1 % и proteinase K до 0,1 мг/мл. Образец инкубировали 45 мин при 56 °C, после чего смесь экстрагировали равным объемом фенола и дважды равным объемом хлороформа. Из водной фазы ДНК принципиально 2,5 объемами 96%-ного этилового спирта, 1/10 объема 5 М ацетата калия. Образец выдерживали 15–20 мин при –20 °C, после чего центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин. Осадок ДНК промывали 70%-ным этанолом, подсушивали при комнатной температуре и растворяли в 100 мкл десорбированной H₂O.

PCR проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ Трис-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого dNTP, 10 пМ каждого праймера, 2,5 ед. Таq ДНК-полимеразы (*Thermus aquaticus*, «Бион», Москва) и 50 нг геномной ДНК. Условия PCR включали в себя начальную денатурацию 95 °C в течение 2 мин, последующие 30 циклов: 95 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 2 мин и конечный синтез 72 °C — 7 мин. Для проведения PCR использовался термоциклер фирмы Eppendorf.

Продукты PCR разделяли в 0,8- и 2%-ном агарозном геле с помощью горизонтального электрофореза в трис-бортатном буфере. Визуализация результатов осуществлялась в ультрафиолетовом свете после окрашивания геля бромистым этидием. Для определения молекулярной массы ампликонов спектра был использован маркер 0,1-kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Для характеристики уровня генетической изменчивости вычисляли долю полиморфных локусов спектра по каждой породе отдельно, по полученным результатам рассчитывали генетические дистанции, проводили кластерный анализ. Математическую обработку данных выполняли с использованием стандартных компьютерных программ «BIOSYS-I».

Результаты исследований и их обсуждение. Праймер (GAG)₆C суммарно у животных пяти пород позволил выявить 38 локусов в спектрах продуктов амплификации. Для каждой породы обнаружены свои особенности представленности этих локусов, отличающиеся по молекулярной массе амплифицируемых фрагментов ДНК (таблица).

Ампликоны спектра условно можно разделить на три группы: наибольшей длины — 2500–1550 п.о., промежуточной — 1300–1000 п.о. и легкие

фрагменты — 850–330 п.о. Отмечается неодинаковая представленность ампликонов этих групп у пород. Так, у СУ и БУ встречается 7 ампликонов наибольшей длины, 4 ампликона со средней длиной, тогда как у Г-ФН 4 ампликона большой молекулярной длиной и 3 ампликона промежуточной длины. Спектр ампликонов у Г-ФД содержит 5 ампликонов большой длины и 4 — средней длины. Л и КС породы представлены только ампликонами средней длины — 6 ампликонов у Л, 5 ампликонов — у КС и легких фрагментов — по 9 ампликонов у Л и КС.

Использование праймера (ACC)₆G позволило суммарно по породам получить 45 ампликонов спектра длиной в пределах 3140–320 п.о. (таблица). Наибольшее количество ампликонов у всех пород располагалось в пределах 2650–520 п.о.

При сравнении двух праймеров по результатам их использования с целью маркирования генофондов пород видно, что получаемая информация существенно отличается. Если мы используем праймер (ACC)₆G, то получаем более полилокусный спектр, чем при использовании праймера (GAG)₆C. Больше всего ампликонов по праймеру (ACC)₆G получили у породы серого украинского скота. Не наблюдали выраженных отличий по количеству локусов в спектрах, полученных у БУ, Л и КС пород. При использовании праймера (ACC)₆G наблюдали многолокусный высокополи-

морфный спектр у СУ и обеих групп голштинов. При использовании праймера (GAG)₆C наибольшее количество полиморфных ампликонов обнаружено у группы Г-ФН, что было связано с учетом ампликонов спектра быка Урана в этой группе животных. Следовательно, каждый используемый праймер в методе ISSR-PCR приводит к образованию праймерспецифического спектра ампликонов, в чем проявляется как генотипическая специфика самой породы, так и нуклеотидной последовательности праймера.

Следует отметить выявленные отличия генетической структуры у представителей разных полов. Так, например, в исследуемой группе животных пород СУ и Г-ФН находились быки (СУ — 4 гол., Г-ФН — 1 гол.). Полученные у этих животных спектры ампликонов существенно отличались от наблюдавшихся у коров. У СУ породы по праймеру (GAG)₆C полученные спектры у быков не вносят таких существенных изменений в суммарный спектр и отличаются от спектра коров по одному локусу — наличию ампликона 2500 п.о., но при его исключении из анализа увеличивается мономорфность спектра. Суммарно 52,9 % локусов спектра мономорфны, а при исключении типичного для быков ампликона — 62,5 %.

Особенно заметно отличается спектр ампликонов у быка Урана от спектра коров группы Г-

Результат, полученный при использовании праймеров (ACC)₆G, (GAG)₆C в ISSR-PCR методике на ДНК животных различных пород КРС

Порода	Последовательность нуклеотидов праймера	Количество ампликонов в спектре	Границы молекулярной длины ампликонов спектра, п.о.	Количество полиморфных ампликонов
Серая украинская	(ACC) ₆ G	32	2950–320	31
	(GAG) ₆ C	17	2500–560	8
Белоголовая украинская	(ACC) ₆ G	18	2650–520	14
	(GAG) ₆ C	18	2500–560	9
Голштино-фризы (Новошепеличи)	(ACC) ₆ G	24	3140–470	23
	(GAG) ₆ C	23	2300–350	22
Голштино-фризы (Днепропетровск)	(ACC) ₆ G	26	2550–370	25
	(GAG) ₆ C	17	2600–510	8
Лебединская	(ACC) ₆ G	19	2550–520	12
	(GAG) ₆ C	15	1400–330	9
Красная степная	(ACC) ₆ G	15	2650–520	11
	(GAG) ₆ C	14	1180–330	9

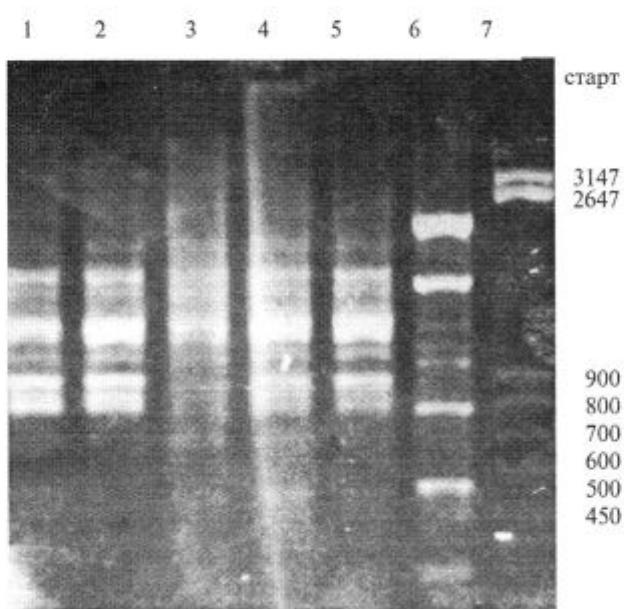


Рис. 1. Спектр ампликонов, полученный методом ISSR-PCR при использовании праймера $(GAG)_6C$: 1–5 — голштино-фризская порода, коровы; 6 — голштино-фризская порода, бык Уран; 7 — маркер молекулярных масс

ФН (рис. 1). Если из суммарного спектра группы Г-ФН исключить 8 ампликонов, специфичных для Урана, то по количеству ампликонов суммарный спектр становится близким к выявленным у других пород. При этом существенно увеличивается количество мономорфных локусов —

от 4,3 до 60 %. Спектр быка Урана отличается от остальных животных Г-ФН наличием 7 ампликонов и отсутствием 9 ампликонов, оказывая существенное влияние на полиморфизм спектра указанной группы.

При использовании в качестве праймера $(ACC)_6G$ после исключения ампликонов быков из общего спектра количество локусов уменьшилось с 45 до 38 (рис. 2). Если рассматривать полученный результат по СУ породе, то уменьшение количества локусов спектра до 26 не сказалось на доле полиморфных локусов. Учитывая спектры быков, получаем 3,1 % мономорфных локусов, а исключая их — 3,8 %. Спектры быков отличаются от спектра коров наличием шести локусов, по которым есть различие и между быками. Ампликоны 2950, 1500, 1050, 690 п.о. выявлены только у одного из них.

У группы Г-ФН после исключения спектра быка Урана количество локусов уменьшилось с 24 до 16, при этом увеличилась мономорфность спектра с 4,2 до 31,2 %. Спектр быка отличается наличием 8 ампликонов и отсутствием 4 ампликонов, которые есть в спектре коров данной группы. На основании индексов генетического сходства, рассчитанных по маркерам ISSR-PCR, построили дендрограмму генетических взаимоотношений между исследованными группами животных [8].

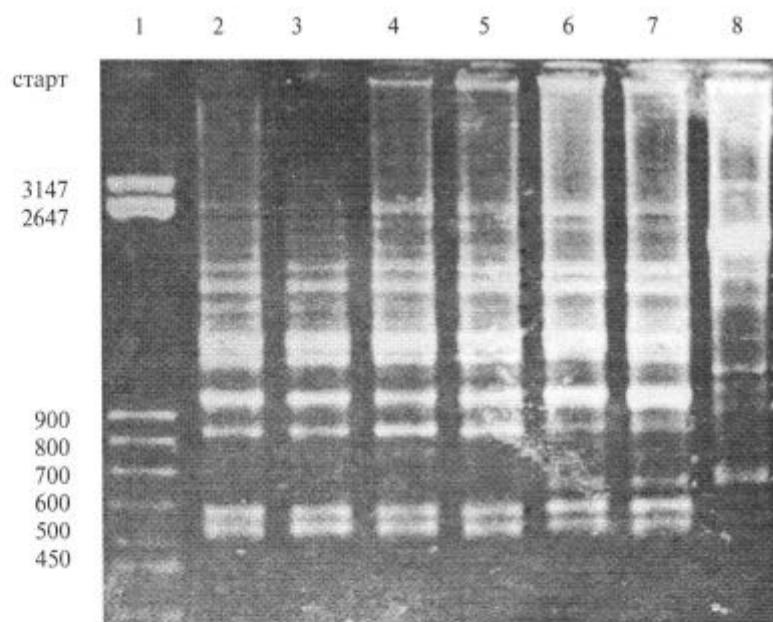


Рис. 2. Спектр ампликонов, полученный методом ISSR-PCR при использовании праймера $(ACC)_6G$: 1 — маркер молекулярных масс; 2–5 — серая украинская порода, коровы; 6–8 — серая украинская порода, быки

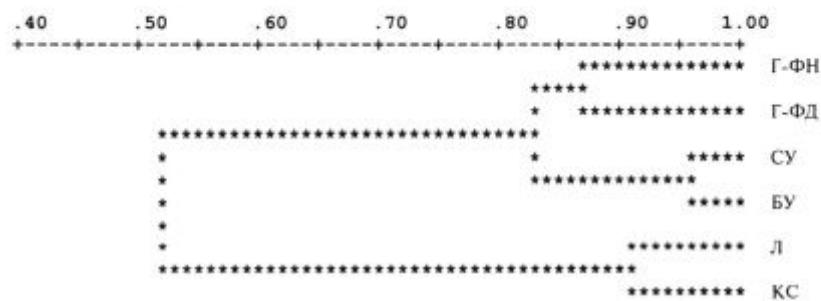


Рис. 3. Дендрограмма генетических взаимоотношений, рассчитанная по спектрам продуктов амплификации при использовании праймера (GAG)₆C в ISSR-PCR у пяти пород КРС (суммарно по всем животным)

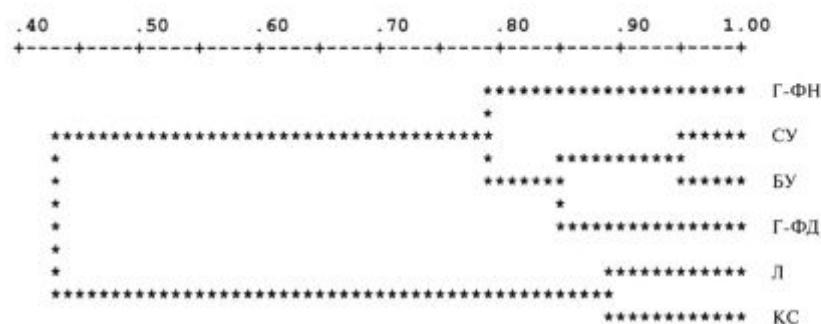


Рис. 4. Дендрограмма генетических взаимоотношений, рассчитанная по спектрам продуктов амплификации при использовании праймера (GAG)₆C в ISSR-PCR у пяти пород КРС, после исключения из спектра ампликонов быков

При сравнении групп животных по спектру ампликонов, полученных при использовании праймера (GAG)₆C, породы животных образовали два кластера, в один из которых входили породы СУ и БУ, а также группы голштино-фризов, во второй кластер — породы Л и КС (рис. 3). При исключении ампликонов быков из общего спектра изменяется структура дендрограммы. В отдельный кластер обособляются Г-ФД и Г-ФН (рис. 4). Наименьшее значение генетических дистанций ($DN = 0,203$) сохраняется между группами голштино-фризов из разных экологических зон, а наиболее удаленной от Г-ФН оказалась группа животных КС породы ($DN = 0,580$). По всем породам суммарно наибольшее значение генетических дистанций наблюдали между БУ и КС породами ($DN = 1,172$).

Распределение исследованных групп животных в зависимости от породной принадлежности по кластерам дендрограммы может свидетельствовать о том, что, возможно, генетическая близость серой украинской и белоголовой украинской обусловлена влиянием вклада предковой формы скота в генофонд этих автохтонных украинских пород и их комбинированным направлением продуктивности.

Наиболее удаленной от других пород по генетическим дистанциям оказалась группа животных красного степного скота, что, возможно, связано с интенсивной селекцией на молочные качества продуктивности и частичной голштинизацией.

Группа животных Г-ФН по значению генетических дистанций ближе к кластеру СУ и БУ. По-видимому, это свидетельствует о том, что при отсутствии по стаду направленной селекционной работы на высокие молочные качества породы, а следовательно, снижение на протяжении десятка лет давления искусственного отбора привело в неблагоприятных экологических условиях к естественному отбору с уклоном в комбинированный тип продуктивности.

Проведенный расчет генетических дистанций по результатам анализа ISSR-PCR с использованием праймера (ACC)₆G позволил получить дендрограмму, в которой по генетической идентичности в один кластер объединялись только две группы животных — СУ и БУ. Значение коэффициента идентичности между ними составило 0,948. Остальные исследованные группы расположились в следующем порядке по мере уменьшения генетического сходства: голштино-

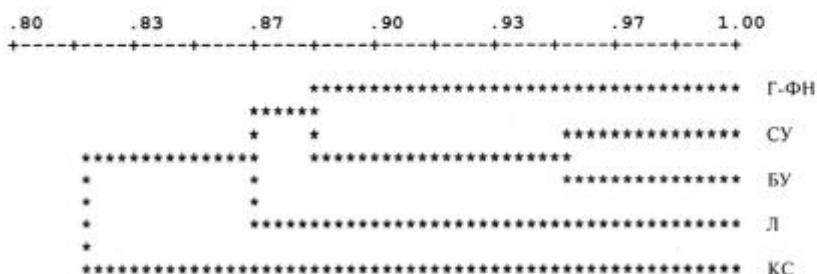


Рис. 5. Дендрограмма генетических взаимоотношений, рассчитанная по спектрам продуктов амплификации при использовании праймера (ACC)₆G в ISSR-PCR у пяти пород КРС (суммарно по всем животным)

фризская, лебединская, красная степная породы (рис. 5). После исключения из общего спектра ампликонов быков распределение животных в зависимости от породной принадлежности не изменилось, но значения генетических дистанций пропорционально увеличились между всеми группами. Наименьшее расстояние наблюдалось между СУ и БУ ($DN = 0,096$), а наибольшее — между КС и Г-ФН ($DN = 0,291$).

При более детальном рассмотрении генетических взаимоотношений внутри групп исследованных животных, в которые входили представители обоих полов, получили рассчитанные для разных праймеров значения генетических дистанций и генетической идентичности животных. Так, например, при использовании в работе праймера (GAG)₆C быки и коровы СУ образовали один кластер, к которому по рассчитанным генетическим параметрам оказалась ближе группа коров Г-ФН, а бык из этой группы животных кластеризовался отдельно на дендрограмме. Генетическое расстояние между быком Ураном и группой коров той же породы составило 0,672, между Ураном и быками СУ породы — 0,656.

По результатам, полученным при использовании праймера (ACC)₆G, один кластер образовали коровы СУ и Г-ФН пород, и значение генетической дистанции между ними составило 0,145. Ближе к кластеру коров располагаются быки СУ породы, а далее — бык Уран, значение генетической дистанции между ним и коровами Г-ФН составило 0,509, между Ураном и быками СУ породы — 0,471.

Учет спектра быков вносит существенный вклад в общий полиморфизм локусов, и при их исключении существенно увеличиваются генетические дистанции между исследованными группами животных разных пород. Возможно, это говорит о той компоненте генома, которая ха-

терна только для гетерогаметного пола животных.

Кроме того, наличие генотипической компоненты только одного быка у группы Г-ФН сближает их в один кластер с Г-ФД, что свидетельствует о генетической специфике быка и его породной принадлежности к коммерческой породе голштинов, импортированных в Украину. Из 13 ампликонов спектра быка Урана в спектре Г-ФД присутствуют 9, а в спектре Г-ФН — только 4 ампликона.

По полученным значениям генетических расстояний между животными можно предположить, что особенность быка Урана по данным молекулярно-генетическим маркерам соответствует характеристике его генетической структуры по биохимическим маркерам, большинство локусов из которых у Урана гетерозиготны [9]. Это, возможно, и благоприятствовало его длительному проживанию и хорошим показателям воспроизводства в зоне экологического бедствия с повышенной загрязненностью радионуклидами. А расхождение по генетической структуре между Ураном и группой коров Г-ФН, по-видимому, свидетельствует о том, что внутри группы идут процессы естественного отбора. Очевидно, бык Уран является прямым потомком (или непосредственным представителем) импортированного голштинского скота, а стадо коров получено в результате воспроизводящегося скрещивания быка Урана и трех коров, переживших аварию на ЧАЭС, а также последующих возвратных скрещиваний с Ураном коров из зоны аварии и частично завезенных в нее.

Расчет генетических дистанций при использовании праймера (ACC)₆G показал, что в этом случае на дендрограмме в общий кластер объединяются коровы СУ и Г-ФН пород. Значение генетической дистанции между ними составило 0,145. Быки СУ от коров той же породы нахо-

дились на расстоянии 0,197. Наибольшее значение генетической дистанции наблюдали между быком и коровами Г-ФН ($DN = 0,509$). Сближение генетической структуры данной группы коров с коровами СУ породы, возможно, свидетельствует о сдвиге характеристик продуктивности голштинов при снятии искусственного отбора и давлении факторов экологического загрязнения в сторону утраты специализации на высокие молочные качества и постепенного преобладания менее специализированных мясо-молочных характеристик [9].

Использование и этого праймера также привело к выявлению отличий между исследованными животными в связи с их принадлежностью к одному из полов. В спектре ампликонов выделяются два локуса, встречающиеся среди исследованных животных только у быков — 1800 и 1460 п.о. Данные об отдельной кластеризации быков и коров при построении дендрограммы по ампликонам, полученным при использовании праймера (ACC)₆G, позволяют предполагать, что эти локусы могут быть связаны с полом животных либо с генами, зависимыми от половых хромосом.

Выводы. При использовании в качестве праймеров двух тринуклеотидных повторов (ISSR-PCR метод) получили данные о специфике генетической структуры пород, внутрипородных групп и между особями, принадлежащими к разному полу. Применение метода анализа полиморфизма анонимных последовательностей ДНК, фланкированных инвертированными микросателлитными повторами, позволяет получать многолокусные спектры, полиморфизм которых отражает специфику генофонда животных определенной породы, а также позволяет проследить направление изменений в структуре генофонда пород под воздействием различных условий отбора. В результате исследования обнаружено, что использование разных по мотиву фрагментов микросателлитных локусов в качестве праймеров приводит к сходным оценкам генетических взаимоотношений между породами крупного рогатого скота. Полилокусность спектров, большие значения получаемых генетических расстояний свидетельствуют об удобстве

использования этого типа молекулярно-генетических маркеров при оценке как межпородных, так и внутрипородных генетических структур и взаимоотношений между группами животных.

SUMMARY. The genetic structure of five cattle breeds from Ukraine was investigated using ISSR-PCR method. Breeding- and sex-specific spectra of amplification products were revealed with two threenucleotide microsatellite primers. The possibility of using ISSR-PCR markers for characterization of genetic relations between breeds of cattle were evaluated.

РЕЗЮМЕ. За використання методу ISSR-PCR проаналізована генетична структура п'яти порід великої рогатої худоби, притаманних території України. Виявлено порідну специфічність спектрів продуктів ампліфікації двох тринуклеотидних праймерів, при використанні яких знайдено продукти ампліфікації, що різняться у тварин різної статі. Оцінено можливості використання ISSR-PCR маркерів задля характеристики генетичних взаємовідносин між породами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Глазко В.И. Генетика изоферментов сельскохозяйственных животных. — М.: ВИНИТИ, 1988. — 212 с.
- Blott S.C., Williams J.L., Haley C.S. Discriminating among cattle breeds using genetic markers // Heredity. — 1999. — № 6. — P. 613.
- Calafell F., Shuster A., Speed W.C., Kidd J.R., Kidd K.K. Short tandem repeat polymorphism evolution in humans // Eur. J. Hum. Genet. — 1998. — 6, № 1. — P. 38–49.
- Arranz J.J., Bayon Y., San Primitivo F. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations // Anim. Genet. — 1996. — 27, № 6. — P. 415–419.
- Lynch M., Milligan B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers // Mol. Ecol. — 1994. — 3, № 2. — P. 91–99.
- Teale A.J., Wambugu J., Gwakisa P.S., Stranzinger G., Bradley D., Kemp S.J. A polymorphism in randomly amplified DNA that differentiates the Y chromosomes of Bos indicus and Bos taurus // Anim. Genet. — 1995. — 26, № 4. — P. 243–248.
- Глазко В.И., Дымань Т.Н., Тарасюк С.И., Дубин А.В. Полиморфизм белков, RAPD-PCR и ISSR-PCR маркеров у зубров, бизонов и крупного рогатого скота // Цитология и генетика. — 1999. — 33, № 6. — С. 30–39.
- Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Natur. — 1972. — 106, № 949. — P. 283–291.
- Глазко Т.Т., Глазко В.І. Генетична мінливість у поколінні великої рогатої худоби в зоні відчуження Чорнобильської АЕС // Вісн. аграр. науки. — 2001. — № 11. — С. 49–54.

Поступила 18.06.02