

УДК 575:599.723

Димань Т. М., Глазко В. І., Ясинецька Н. І.
ГЕНЕТИЧНА ВАРІАЦІЯ ТУРКМЕНСЬКОГО КУЛАНА
(*EQUUS HEMIONUS KULAN*)

Вступ

Список рідкісних та зникаючих видів невпинно зростає, постійно нагадуючи нам про подальшу руйнацію природи і на неспроможність людини поки що збалансувати процеси самозабезпечення без знищення довкілля. У зв'язку з цим останнім часом особливо актуальними стають дослідження біологічної різноманітності, зокрема вивчення генетичного аспекту цієї проблеми. Сучасні підходи до генетичної оцінки біологічних ресурсів включають ідентифікацію поліморфних молекулярно-генетичних маркерів у досліджуваного виду, що є необхідним для спеціальної генетики, створення ефективних програм збереження рідкісних видів.

Мета даної роботи полягала у аналізі генетичної мінливості одного із диких видів копитних, чисельність якого різко скоротилась у середині минулого століття внаслідок інтенсивного освоєння людиною степів і напівпустель, – туркменського кулана.

Матеріали і методи досліджень

Вихідним матеріалом для досліджень були зразки крові (лейкоцити, еритроцити, плазма) та гомогенати сердечних м'язів куланів ($n=10$), які відтворюються в умовах Біосферного заповідника «Асканія-Нова» ім. Ф. Е. Фальц-Фейна. Роботу з розведення куланів у цьому заповіднику розпочато у 50-ті роки, і нині їх загальна чисельність стабілізувалась на рівні 60–70 голів [1].

Генетичну структуру виду вивчали за використання двох типів молекулярно-генетичних маркерів – генетико-біохімічних та маркерів ISSR-PCR (*inter simple sequence repeat*). Останні набули великого поширення при вивченні геномів рослин і отримуються при ампліфікації в результаті полімеразної ланцюгової реакції ділянок ДНК, які заключені між інвертованими повторами мікросателітних локусів [2].

За використання методів електрофоретичного поділу білків у крохмальному і поліакриламідному гелях з подальшим гістохімічним фарбуванням було досліджено 30 генетико-біохімічних систем. Їх перелік, загальноприйняте позначення, досліджувана тканина, буферна система наведені у попередніх роботах [3].

Ядерну ДНК виділяли за стандартною методикою. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за використання праймерів, комплементарних динуклеотидним мікросателітним локусам $(AG)_9C$, $(GA)_9C$, $(AC)_9T$ та $(AC)_9C$. Реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила: 50 mM KCl, 10 mM тріс-HCl (pH 9,0), 0,01% тритон X-100, 0,3 mM кожного dNTP, 2 mM

MgCl₂ (Promega), 0,2μ M праймера, 0,5 од. акт. полімерази *Thermus aquaticus* («Диалат LTD», Москва), 20–50 нг ДНК.

PCR проводили на ампліфікаторі «MasterCycler Gradient» (Німеччина). Температурний режим PCR–ампліфікації був таким: початкова денатурація – 2 хв. при 94°C; 30 циклів: 30 с при 94°C, 30 с при 54°C, 2 хв. при 72°C; термінальна елонгація – 10 хв. при 72°C; охолодження до 4°C.

Продукти ампліфікації розділяли шляхом електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі. Візуалізацію результатів форефу проводили під ультрафіолетовими променями на транслюмінаторі після фарбування гелю бромистим етидієм. Для визначення розмірів продуктів ампліфікації використано маркер молекулярних мас 0,1–kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Результати досліджень та їх обговорення

Електрофоретичний аналіз білків плазми крові та ферментів еритроцитів дозволив виявити у групи туркменських куланів генетично детермінований поліморфізм 7 генетико-біохімічних систем: TF (трансферин), AP (лужна фосфатаза) 6PGD (6-фосфоглюконатдегідрогеназа), G6PD (глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа), АК (аденілаткіназа), ME (малікензим), FH (фумаратгідратаза). Решта систем були мономорфними.

На відміну від досліджених раніше видів *Equus przewalskii* та *Equus caballus* з кількістю алельних варіантів відповідно 3 і 4 [4] за локусом TF, в групі туркменських куланів виявили лише два алелі, позначені нами А – швидкий і В – повільний за електрофоретичною рухливістю. Вони кодували два генотипи – АА і АВ, гомозиготи за повільним варіантом не виявлені. Частота зустрічальності варіанта А становила 0,600. Гетерозиготність складала 80 % при очікуваному значенні 50,5 %.

Швидкий алельний варіант превалював і у системі АК ($q=0,800$). Гетерозигот за цим локусом не виявлено, що зумовило відхилення розподілу генотипів від стану рівноваги відповідно до закону Харді-Вайнберга ($\chi^2=12,8$, $P<0,001$). Локуси ферментів пентозофосфатного шляху 6PGD та G6PD вирізнялись переважанням повільних електрофоретичних варіантів, їх частота зустрічальності становила відповідно 0,350 та 0,250. Відхилення від рівноважного стану у бік надлишку гомозигот спостерігали у системі G6PD ($\chi^2=5,65$, $P<0,05$).

Двома кодомінантними алелями F та S кодуються три генотипи ME – FF, FS і SS. Виявлена більша частота зустрічальності швидкого варіанту ($q=0,600$). Гетерозиготами у даному випадку були 20% тварин. У системі FH з більшою частотою зустрічався повільний за електрофоретичною рухливістю варіант ($q=0,600$), частка гомозиготних тварин була значною і складала 60%. За локусом AP лише 20% досліджених особин мали гетерозиготний генотип, частоти зустрічальності двох альтернативних алелей склали: швидкого – 0,700, повільного – 0,300.

Таким чином, частка поліморфних локусів у групі досліджених туркменських куланів складала 23,3%. Середня гетерозиготність на локус на особину – 0,082. Дані популяційно-генетичні параметри відповідають відносно високому рівню генетичної мінливості, якщо брати до уваги той факт, що асканійська популяція куланів є малою ізольованою популяцією з високим ступенем інбридингу.

За аналізу маркерів ISSR–PCR були отримані продукти ампліфікації, які мали розміри в межах 2,5–0,4 kb. Аналіз повторних ампліфікацій ДНК одних і тих же тварин (не менше трьох повторностей) дозволив розділити спектр ампліконів на «мажорні» зони, які однозначно і чітко відтворювались від експерименту до експерименту, і «мінорні» зони, ідентифікація котрих була менш однозначною. При порівнянні ДНК-патернів різних особин брали до уваги лише ті продукти, які стабільно відтворювались у всіх повторностях.

Кількість ампліконів варіювала залежно від послідовності праймера (табл. 1). Найменше продуктів отримано при використанні праймера (AG)₉C, їх спектр обмежувався 8 ампліконами розмірами 0,6–1,5 kb. Спільними для всіх праймерів продуктами ампліфікації були амплікони довжиною 0,9 та 1,4 kb. Отже, можна констатувати, що розглянуті в роботі динуклеотидні мікросателітні повтори зустрічаються у геномній ДНК кулана з відносно високою частотою.

Разом з маркерами структурних генів маркери ISSR–PCR можуть слугувати додатковою видовою характеристикою. Проте, на відміну від маркерів структурних генів (генетико-біохімічних систем), за жодним із проаналізованих ДНК-маркерів не виявили внутрішньовидового поліморфізму: за прийнятих нами умов проведення полімеразної ланцюгової реакції всі досліджені тварини мали однаковий спектр продуктів ампліфікації.

Таблиця 1. Зустрічальність продуктів ампліфікації різної довжини у туркменського кулана за використання різних маркерів ISSR–PCR

Маркер	(AG) ₉ C	(GA) ₉ C	(AC) ₉ T	(AC) ₉ C
0,4	–	+	–	–
0,5	–	+	–	+
0,6	+	–	–	+
0,7	+	+	–	–
0,8	+	–	–	+
0,9	+	+	+	+
1,0	+	–	+	–
1,1	–	–	+	+
1,2	–	+	–	+
1,3	+	+	–	–
1,4	+	+	+	+
1,5	+	–	+	+
1,6	–	–	+	–
1,7	–	+	+	+
1,8	–	–	+	–
1,9	–	+	–	–
2,0	–	–	–	+
2,1	–	–	–	–
2,2	–	–	+	–
2,3	–	–	–	–
2,4	–	–	–	–
2,5	–	+	–	–

Отже, оцінка внутрішньовидової генетичної гетерогенності туркменського кулана виявилась більш ефективною при використанні біохімічних маркерів, ніж при використанні ДНК-маркерів. Це означає, що маркери ISSR–PCR не є інструментом, використання якого ізольовано від інших підходів забезпечить успіх у вирішенні проблеми внутрішньовидової диференціації. Передбачається, що їх використання у подальших дослідженнях дозволить виявити структурно-функціональні особливості тандемних повторів, маркуючих ділянки геному, які еволюціонують з різною швидкістю.

Список літератури

1. **Жарких Т. Л., Ясинецкая Н. И.** Социальная организация и поведение туркменского кулана (*Equus hemionus kulan*) в «Аскании-Нова» // Вісті Біосферного заповідника “Асканія-Нова”: Проблеми екомоніторингу та збереження біорізноманітності. – Асканія-Нова, 1998. – С. 74–80. 2. **Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.** Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. – 1994. – Vol. 20. – P. 176–183. 3. **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. – Т. 33, № 6. – С. 30–39. 4. **Дымань Т. М., Глазко В. И.** Порівняльний аналіз генетичної мінливості коня Пржевальського та домашніх порід коней // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. – 1999. – Вип.7. – С. 196–202.

Summary

Genetic variation in Turkmenian kulan (*Equus hemionus kulan*). — **Dyman T., Glazko V., Yasinetskaya N.** — The genetic structure of *Equus hemionus kulan* on different types of molecular-genetic markers (proteins, DNA-markers) was studied. It was analysed 30 genetical-biochemical systems and 4 ISSR–PCR markers with sequences (AG)₉C, (GA)₉C, (AC)₉T, (AC)₉C. High level of genetic variability was revealed for group of animals investigated, the average heterozygosity – 0,082. Markers of structural genes were revealed more effective for intrabreed differentiation.