

УДК 575.113:577.21:636.05

Популяційно-генетичні характеристики вівці свійської та барану сніжного за молекулярними маркерами

Олександра Городна, Алла Маріуца, Валерій Глазко

Популяційно-генетичні характеристики вівці свійської та барану сніжного за молекулярними маркерами. — Городна О., Маріуца А., Глазко В. — На прикладі дослідження поліморфізму за різними типами молекулярно-генетичних маркерів (структурні гени, ISSR–PCR) у двох видів, що належать до роду *Ovis*, показано специфіку роботи наведених маркерів, а також втягування неоднакових ділянок ДНК у процес дивергенції генофондів, виявлено суттєві відмінності між внутрішньовидовою і міжвидовою диференціацією генетичних структур досліджених видів.

Ключові слова: популяційні характеристики, молекулярні маркери, вівця свійська, баран сніжний.

Адреса: Інститут агроекології УААН, вул. Метрологічна, 12, Київ, 03143, Україна.
E-mail: glazko@biotech.relc.com.

The population-genetic characteristics of cheep and snow ram on molecular markers. — Gorodna O., Mariutsa A., Glazko V. — Significant differences between intraspecific and interspecific genetic structures differentiation of two *Ovis* species were revealed utilizing some types of molecular genetic markers (the structural genes and ISSR–PCR markers). Is shown specify of activity these markers, and also, that in process of a divergence genetic structures the not identical segments DNA were involved.

Key words: characteristics of population, molecular markers, *Ovis aries*, *Ovis nivicola borealis*.

Address: Institute of agroecology UAAS, st. Metrologichna, 12, Kyiv, 03143, Ukraine.
E-mail: glazko@biotech.relc.com.

Вступ

Традиційно припускається, що послідовне накопичення незначних змін генів призводить до якісного прояву їх на фенотиповому рівні появою нового виду. Дослідити це питання можна шляхом порівняння популяційно-генетичних структур різних популяцій одного виду і близькоспоріднених видів одного роду. Зручною моделлю для такого аналізу можуть бути кілька порід одного виду і дикий вид цього ж роду, наприклад, породи овець і сніжного барану. Для таких порівнянь в більшості випадків використовують різні типи молекулярно-генетичних маркерів, зокрема, генетико-біохімічні системи (Powell, 1975; Frisch et al., 1997).

В останні роки дослідники використовують нові типи молекулярно-генетичні маркери, за допомогою яких можна вивчати зміни не лише за структурними генами, а й за високо-поліморфним фрагментом ДНК, фланкованих мікросателітними локусами (ISSR–PCR — Inter simple sequence repeats) (Глазко и др., 1999). Поліморфізм за генетико-біохімічними маркерами більше пов'язаний з дією природного або штучного відборів, тоді як ISSR–PCR маркери безпосередньо не залежать від такого впливу.

Нашою метою було дослідити поліморфізм генетичної структури порід всередині виду у порівнянні з іншим видом цього ж роду з використанням різних типів молекулярно-генетичних маркерів. Окрім проведеного дослідження особливостей генетичної структури двох видів роду *Ovis* (свійського і дикого) вивчено генетико-біохімічних маркерів (поліморфізм білків) та ділянок ДНК, фланкованих інвертованими мікросателітними повторами (ISSR–PCR).

Матеріали і методи

Породи свійських овець мають спільних предків із сучасними видами диких баранів, одним із яких є баран сніжний східного Сибіру. Це рідкісний вид, занесений до Червоної Книги, генофонд якого був ізольований тривалий час. Досліджено зразки крові (еритроцити, лейкоцити, плазма) свійської вівці (*Ovis aries* L.) — багатоплідних каракульських овець асканійського породного типу, господарства "Маркесво" Інституту тваринництва степових районів (Асканія-Нова, Херсонська область), овець сокільської породи, яких утримували на племзаводі «Сокільський» (Кобиляцький р-н, Полтавська область), овець кулундинської породи, що відтворюються у експериментальному господарстві "Черга" (Алтайський край, Росія), і дикого виду — барану сніжного (*Ovis nivicola borealis*), що відтворюється в умовах Путоранського заповідника.

При використанні методів електрофоретичного розподілу білків у крохмальному і поліакриламідному гелях з наступним гістохімічним забарвленням проаналізовано поліморфізм 30-ти генетико-біохімічних локусів. Досліджували наступні генетико-біохімічні системи: TF (трансферин), HB (гемоглобін), ES (естераза К.Ф.3.1.1.1), LAP (лейцинариламінотрипсидаза К.Ф.3.4.11.1), ME (малік ензим К.Ф.1.1.1.40), LDH (лактатдегідрогеназа К.Ф.1.1.1.27), DP (діафороза К.Ф.1.6.2.2), NP (пуриннуклеозидфосфорилаза К.Ф.2.4.2.1), АК (аденілаткіназа К.Ф.2.7.4.3), СК (креатинкіназа К.Ф.2.7.3.2), GPI (глюкозофосфатізомераза К.Ф.5.3.1.9), MPI (манозофосфатізомераза К.Ф.5.3.1.8), MDH (малатдегідрогеназа К.Ф.1.1.1.37), PEP A (пептидаза А К.Ф.3.4.23.7), SORDH (сорбітолдегідрогеназа К.Ф.1.1.1.14), PGM (фосфоглюкомутаза К.Ф.2.7.5.1).

Поліморфізм за мікросателітними ділянками ДНК вивчали із застосуванням методики ISSR-PCR динуклеотидних праймерів: (GA)_nC, (AG)_nC, (AC)_nT. Для визначення довжин фрагментів використовували маркер молекулярної ваги 0,1–kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Математичну обробку даних виконували з використанням комп'ютерних програм «Statistica» та «BIOSIS-1».

Результати та обговорення

В результаті виконаних досліджень отримано наступні дані. У порід вівці свійської (асканійський багатоплідний каракуль, сокільська, кулундинська) виявили поліморфізм за 8-ма локусами генетико-біохімічних систем — TF, ES, LAP, HB, ME, LDR, DP, NP. Розподіл аельних варіантів за локусами білків плазми крові у вівці кулундинської відрізнявся від типового для асканійського багатоплідного каракулю і сокільської вівці (рис. 1).

Зокрема, за локусом TF переважав аель TfD у вівці кулундинської, на відміну від інших, у яких переважав TfC. TfE виявили у каракулю, а TfF — у кулундинської породи. Статистично достовірні відміни між породами виявили за локусом LAP: частота аельного варіанту А у вівці кулундинської (0,133) виявилась нижчою, ніж у асканійського каракулю (0,485) і сокільської (0,447) ($P < 0,01$). В системі LDR аельний варіант, що детермінує високу активність 2-ї та 3-ї ізоформ лактатдегідрогенази еритроцитів, частіше зустрічався у кулундинської породи (0,778). Для решти поліморфних локусів явних відмінностей у розподілі аельних частот між породами не виявлено.

(+) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

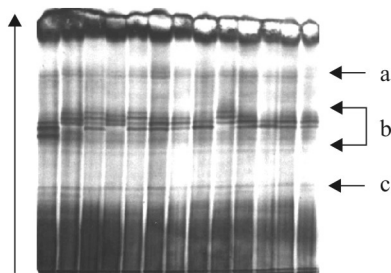


Рис. 1. Електрофоретичний спектр білків плазми крові овець породи сокільська у поліакриламідному гелі:

a — рецептор до вітаміну Д. Доріжки 3–7, 9, 13 генотип АВ; 1, 2, 8, 10–12 — генотип ВВ;

b — трансферин. Доріжка 1 генотип СД; доріжки 2, 4, 9 генотип АА; доріжки 3, 5 генотип АС; доріжки 6, 7, 10 генотип ВС; доріжки 8, 11–13 генотип СС;

c — посттрансферин 2.

Таблиця 1. Рівень середньої гетерозиготності у досліджених видів тварин роду *Ovis*

Вид, порода	Генетико-біохімічні системи												H _{ср} %
	Tf	Hb	Dp	Ldr	Est	NP	ME	Lap	AK	CK	GPI	MPI	
Сокільська	60	31	75	41	9	48	49	58	0	0	0	0	31
Асканійський багато-плідний каракуль	100	17	57	47	50	43	40	26	0	0	0	0	32
Кулундинська	71	33	44	33	50	47	29	13	0	0	0	0	27
Баран сніжний	50	0	0	0	0	0	0	0	40	60	40	40	19

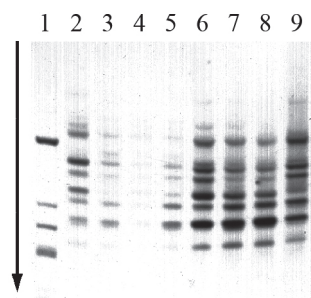
У досліджених особин барану сніжного виявлено поліморфізм за п'ятьма локусами: TF, GPI, MPI, AK, CK. За локусом трансферину виявили чотири генотипи (AA, AD, BD, DD), найбільш часто зустрічався алель D. За локусом GPI у барана сніжного виявили два алельних варіанти — F (швидко мігруючий), та S (повільно мігруючий) і всі три можливі генотипи. За системою MPI виявлено два ізоформи різної рухливості з перевагою за частотою повільного алелю. За локусом AK — переважав швидкий варіант. У системі CK два альтернативних варіанти зустрічалися однаково часто.

Під час порівняння генетичної структури досліджених видів тварин за локусами GPI, MPI, AK та CK у вівці свійської поліморфізму не виявлено (табл. 1). У барана сніжного локус гемоглобіну був мономорфним і виявлено тільки варіант, який ідентичний за електрофоретичною рухливістю повільному типу гемоглобіну вівці свійської. Мономорфними виявились і локуси NP, LAP, LDR, ME, ES, DP. Подібність між вівцею свійською та бараном сніжним виявлено за рухливістю ферментів MDH, ME, PEP A, SORDH, PGM.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що досліджені види помітно відрізняються один від одного за поліморфізмом генетико-біохімічних систем: у вівці свійської поліморфізм спостерігається переважно за системами TF, HB, DP, LDH, ES, NP, ME, LAP, у сніжного барана — TF, AK, CK, GPI, MPI. Загальною рисою генофондів цих двох видів виявився тільки поліморфізм за локусом трансферину.

Для аналізу відмінностей між породами вівці свійської і виду барану сніжного використовували, крім порівняльного аналізу за генетико-біохімічними маркерами, також використано аналіз спектрів ампліфікації ділянок ДНК, які фланковані інвертованими повторами мікросателітних локусів (Zietkiewicz et al., 1994). Аналіз електрофоретичних спектрів продуктів ISSR-PCR ампліфікації, дозволив виявити міжвидові відмінності за цим типом молекулярно-генетичних маркерів. Спектри ампліфікації ДНК мали 6–10 ампліконів, в залежності від використаного праймеру. Розмір продуктів варіював у межах 2,5–0,5 т.п.о. Кожний продукт ампліфікації розглядали як окремий локус відповідної довжини (рис. 2).

При використанні праймера (GA)₉C розмір сімох ампліконів, що увійшли до аналізу, знаходився у межах 2,0–0,5 т.п.о. У двох видів досліджених тварин спостерігали спільні продукти ампліфікації розміром 2,0, 1,5 та 0,6 т.п.о. Фрагменти довжиною 1,6 і 1,7 т.п.о. виявлено тільки у вівці свійської, а довжиною 1,4 та 0,5 т.п.о. — тільки у барана сніжного. Внутрішньовидових відмінностей за використання даного праймера не виявили.

Рис. 2. Спектри продуктів ампліфікації ISSR-PCR у представників роду *Ovis* за використання праймеру (AG)₉C:

- 1 — маркер молекулярних мас;
- 2–5 — асканійський багатоплідний каракуль;
- 6–9 — кулундинська вівця

Таблиця 2. Амплікони спектру, отримані за використання трьох динуклеотидних праймерів у двох видів роду *Ovis*

Праймери	(AG) ₉ C	n	(GA) ₉ C	n	(AC) ₉ T	n
Загальна кількість локусів у вівці свійської	7	0	7	0	10	0
Загальна кількість локусів у дикого виду	7	–	7	–	9	–
Кількість видоспецифічних локусів	3		4		3	

n — кількість породоспецифічних локусів у вівці свійської

Для іншого динуклеотидного праймера з послідовністю (AG)₉C мали дещо іншу картину (табл. 2). Спектр ампліконів представлено шістьма фрагментами у асканійського багатоплідного каракуля, 7 — у вівці кулундинської та 7 — у барана сніжного з довжиною у межах 2,5–0,5 т.п.о. Продукт амплікації, специфічний для вівці свійської, мав довжину 2,5 т.п.о. Амплікони довжиною 2,2 і 0,9 т.п.о. виявлено тільки у дикого виду. Продукти амплікації розміром 1,7, 1,0 і 0,6 т.п.о. були притаманні обом видам баранів — domestikованого і дикого.

ISSR-PCR спектр за використання праймера (AC)₉T представлено 10-ма смугами у свійського виду і 9 — у дикого з довжинами у межах 2,5–0,6 т.п.о. Однаковими були продукти амплікації розміром 2,0, 1,8, 1,7, 1,5, 1,4, 1,1, 1,0 та 0,9 т.п.о. Специфічними для представників domestikованого виду були продукти довжиною 1,3 і 0,85 т.п.о., для барана сніжного — амплікони довжиною 0,95 т.п.о. Спектри ампліконів у двох порід вівці свійської не відрізнялись між собою.

В результаті вивчення маркерів ISSR-PCR у асканійського багатоплідного каракулю, кулундинської вівці та сніжного барану виявили, що у процес дивергенції генофондів цих видів втягувались окремі ділянки ДНК, які відповідають ряду ампліконів, отриманих при використанні динуклеотидних праймерів: (GA)₉C — 1.7, 1.6, 1.4 і 0.5 т.п.о.; (AG)₉C — 2.5, 2.2, 0.9 т.п.о.; (AC)₉T — 1.3, 0.95, 0.85 т.п.о. Таким чином, виявили сумарно за трьома динуклеотидними праймерами 10 видоспецифічних локусів. Вочевидь, що динуклеотидні праймери результативні за використання їх для міжвидової характеристики тварин одного роду, але мало інформативні при міжпородній оцінці генетичної структури (табл. 2).

Використання даних методик в нашій роботі дозволило охарактеризувати поліморфізм окремих локусів і проаналізувати рівень генетичної спорідненості трьох порід всередині виду та двох видів одного роду за двома типами молекулярно-генетичних маркерів.

З аналізу отриманих даних витікає, що оцінки міжвидової генетичної диференціації за допомогою ISSR-PCR маркерів суттєво варіюють в залежності від використаного праймера. Кожний праймер виявляє свій специфічний спектр продуктів амплікації. За ISSR-PCR маркерами виявили тільки міжвидові відмінності спектру ампліконів свійської вівці від дикого виду (баран сніжний).

Висновки

Відмінності між породами, і у подальшому між видами, можна охарактеризувати на рівні змін у залученні окремих алелів генетико-біохімічних систем до мікро- і макроеволюційних процесів видоутворення. При породоутворенні накопичуються зміни у співвідношенні алельних варіантів спільних поліморфних локусів генетико-біохімічних систем. При порівнянні виявленого поліморфізму за дослідженими генетико-біохімічними системами у вівці свійської та барану сніжного видно, що поліморфними у них є різні локуси. У обох видів поліморфним є локус трансферину, а за п'ятьма мономорфними системами збігалася електрофоретична рухливість. Аналіз отриманих експериментальних даних між різними видами у межах роду показав пріоритетну кількість (67 %) поліморфних біохімічних систем у виду вівці свійської, тоді як у дикого виду — барану сніжного — з досліджених тільки 42 % є поліморфними.

Отримані дані свідчать про те, що міжвидові відмінності в межах одного й того ж роду виявляються за іншими генетико-біохімічними системами, а також ISSR-PCR маркерами, ніж внутрішньовидовий поліморфізм. Таким чином, отримані нами дані можуть вказувати на те, що видоутворення не обов'язково пов'язане з поступовим накопиченням незначних змін у геномі, а відмінності

у виду вівці свійської накопичуються за генетико-біохімічними системами, які не поліморфні у барана сніжного, дикого виду цього ж роду *Ovis*.

Література

- Powell J. R.* Protein variation in natural populations of animals // *Evolutionary Biology*. — 1975. — Vol. 8. — P. 79–119.
- Frisch J. E., Drinkwater R., Harrison B., Johnson S.* Classification of the southern African sanga and east African short-horned zebu // *Animal Genetics*. — 1997. — Vol. 98, № 2. — P. 77–83.
- Глазко В. И., Дымань Т. Н., Тарасюк С. И., Дубин А. В.* Поліморфізм белков, RAPD–PCR и ISSR–PCR маркерів у зубров, бизонов и крупного рогатого скота // *Цитология и генетика*. — 1999. — Том 33, № 6. — С. 30–39.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.* Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. — 1994. — Vol. 20. — P. 176–183.

Надійшло до редакції: 24 листопада 2005 р.