

УДК 574.17.5:598.13

О.С. МАЗУРОВА, Н.А. АЙТХОЖИНА

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА И ДИВЕРГЕНЦИИ ГЕНОМНОЙ ДНК ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ГОРНЫХ БАРАНОВ РОДА *OVIS*

(Институт молекулярной биологии и биохимии им.М.А.Айтхожина)

Приведены экспериментальные данные о популяционно-генетическом полиморфизме горных баранов и архаров, полученные на основании проведенных микросателлитного и RAPD-анализа ДНК этих животных. Всего было исследовано 52 образца геномной ДНК животных, принадлежащих к шести различным популяциям четырех подвидов горных баранов, обитающих на территории Казахстана.

RAPD-анализ проводили со 170 различными олигонуклеотидами, микросателлитный полиморфизм оценивали по 25 различным локусам.

На основании данных, полученных при микросателлитном и RAPD-анализе, построена консенсусная дендрограмма генетического сходства исследованных животных.

Вопросы систематики различных групп организмов, в том числе и баранов группы муфлон-уриал-архар-аргали до настоящего времени остаются нерешенными. Таксономия настоящих баранов привлекала на протяжении последних 100 лет внимание выдающихся систематиков, таких как Северцов, Насонов, Цалкин, Соколов и др. За более чем вековую историю изучения систематики и таксономии рода *Ovis*, вопросов не только не уменьшилось, но даже добавилось. Так, например, до конца не определен статус *O.a.collium*, *O.a.nigrimontana*, *O.a.karelini*, которых некоторые авторы на основании цитогенетических данных предлагают объединить в одну группу – собственно архаров, однако наличие некоторых морфологических и поведенческих различий не позволяет это сделать. Самостоятельность *O.a.litteldalei* также подвергается сомнению. До настоящего момента остаются нерассмотренными и вопросы популяционно-генетического разнообразия этой группы животных. При этом стоит отметить, что все вышеупомянутые представители рода *Ovis* относятся к редким, а некоторые к исчезающим видам, занесенным в Красную Книгу. Все это делает изучение данной группы животных крайне актуальным.

В последнее время для изучения внутривидовой популяционной изменчивости и межпопуляционных взаимоотношений в разных группах организмов

все чаще используются методы RAPD-PCR и анализа микросателлитных повторов. Основаниями для этого явились некоторые особенности данного типа ДНК-маркеров, в том числе: метод RAPD-PCR прост в исполнении, требует малое количество ДНК, и при его использовании нет необходимости в радиоактивных материалах; микросателлитные повторы встречаются у всех эукариотических организмов, их анализ требует минимального количества ДНК, а высокие темпы мутирования в этих локусах приводят к накоплению популяционно-специфических мутаций, что позволяет проводить детальный анализ популяционной структуры [1].

В задачи нашего исследования входило определение особенностей генетической структуры, подразделенности и дифференциации популяций *O.a.collium*, *O.a.nigrimontana*, *O.a.karelini* и *O.a.litteldalei* на основе анализа полиморфизма 25 микросателлитных локусов и RAPD-анализа с одним и двумя праймерами.

Материалы и методы. Объектами исследования послужили 52 образца геномной ДНК, полученные из биологического материала представителей различных популяций и группировок горных баранов (табл. 1).

Препараты ДНК выделяли из лимфоцитов крови и из фиксированных в этаноле семенников. В первом случае использовали стандартный метод фенол-хлороформной экстракции, а во втором – модифицированный метод Арриджи [2].

Для RAPD-анализа использовали одиночные случайные и парные олигонуклеотидные праймеры. Программа проведения ПЦР, а также схема приготовления и смешивания ингредиентов реакционной смеси соответствовала опубликованным рекомендациям [3].

Таблица 1. Информация об использованных в исследовании образцах биологического материала

Подвид	Место сбора образцов	Кол-во обр
<i>Ovis ammon collium</i>	Центральный Казахстан, Карагандинская обл.	32
<i>Ovis ammon litteldalei</i>	Жамбылской обл. (Чу-Илийская группировка)	4
	Джунгарского Алатау	4
	Горы Арганаты	4
<i>Ovis ammon nigrimontana</i>	Хребет Каратау	5
<i>Ovis ammon karelini</i>	Центральный Тянь-шань	3

Микросателлитный анализ проводился по 25 различным локусам. Последовательности праймеров для исследованных локусов и условия проведения ПЦР были взяты из литературных источников [4,5]. Продукты реакции разделяли методом гель-электрофореза в 8 и 12%-ном полиакриламидном геле. Гель окрашивали бромистым этидием (0.05%), промывали водой, просматривали в ультрафиолетовом свете на гель-документирующей системе фирмы BIORAD (USA) и фиксировали в цифровом формате.

Анализ электрофореграмм, полученных методом RAPD-анализа проводился визуально: учитывались все полосы поддающиеся разрешению. По результатам этого анализа были построены матрицы генетических расстояний. Первоначально строилась суммарная матрица данных типа «объект-признак», где присутствие полосы обозначалось «1», отсутствие – «0». На основе этих данных были вычислены матрицы различий с использованием Евклидовых дистанций, а также индексов Чекановского и Жаккара. Генетические расстояния рассчитывали также по формуле Нея [6]. Для построения филогенетических древ использовался метод невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Для анализа генетической структуры и дифференциации популяций исследуемых представителей рода *Ovis* рассчитывали частоты аллелей и генотипов в каждой популяции, наблюдаемую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготность, долю полиморфных локусов по 99%-ному (P_{99}) и 95%-ному (P_{95}) критериям. Межпопуляционную аллельную гетерогенность оценивали по стандартному χ^2 -тесту. Для расчета этих показателей использовали программу Генорор 3.3. Генетическую подразделенность

характеризовали, используя коэффициенты F-статистик райта и G-статистику Неи. Генетическую дифференциацию популяций определяли по коэффициенту генетических дистанций Неи (D_s) и $D_{Reynolds}$ (использовали пакеты программ Algerium 2.0 и POPULATIONS 1.2.29) [5]. Полученная матрица генетических различий была проанализирована методом многомерного шкалирования. На основании рассчитанных значений генетических дистанций был проведен кластерный анализ методом объединения ближайших соседей с помощью программы POPTREE, статистическая значимость полученных кластеров определялась методом bootstrap-анализа. Консенсусные дендрограммы строили с помощью пакета программ Phylip и Treeview.

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследования нами был проведен скрининг одиночных случайных праймеров и сочетаний олигонуклеотидов для RAPD-анализа. Всего в работе для решения поставленной задачи была исследована возможность использования 30 random-праймеров и более 140 сочетаний олигонуклеотидов. Из них для дальнейших исследований нами было отобрано 3 одиночных случайных праймера и 5 сочетаний олигонуклеотидов, дававших при амплификации с ДНК горных баранов воспроизводимый набор RAPD - ампликонов и выявлявших высокий уровень межпопуляционных различий изучаемых животных.

На рисунке 1 представлена фотография электрофореграммы распределения продуктов амплификации ДНК баранов с праймером 3 (5'-TCC ACT CCT G-3').

Как видно, использование данного праймера при амплификации с ДНК баранов позволило

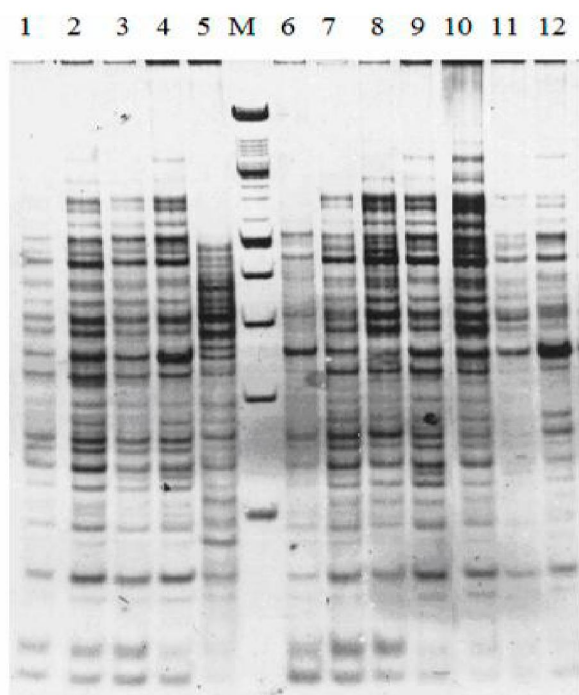


Рис. 1. а) Электрофореграмма распределения продуктов амплификации ДНК горных баранов с праймером 3; М – маркер молекулярной массы 1/Pst.

выявить достаточно высокий уровень межпопуляционного полиморфизма. Число амплифицированных фрагментов с этим олигонуклеотидом

колеблется от 14 до 31 и они равномерно распределяются в зоне от 260 до 2900 пн.

При проведении нами микросателлитного анализа геномной ДНК горных баранов в 25 проанализированных локусах было выявлено 174 аллели (табл. 2).

Все локусы были полиморфными, число аллелей для каждого локуса колебалось от 18 до 2. На основании рассчитанных частот встречаемости аллелей были определены генетические дистанции, которые варьировали в узких пределах от 0,093 до 0,210. Наибольшие различия были установлены для пары *O.a.collium*/*O.a.karelini*, наименьшие для *O.a.collium*/*O.a.litteldalei*, популяции *O.a.litteldalei* из группы Чу-Илийских архаров и группировки из Арганаты показали практически одинаковые значения D_s . При этом рассчитанные значения дистанций Рейнольдса были в числовом выражении несколько ниже, чем стандартные дистанции Неи, но выявляли аналогичный им уровень родства исследуемых популяций. Так наиболее близкими по значениям Рейнольдса оказались группы архаров из Чу-Илийской группировки и гор Арганаты ($D_{Reynolds} = 0,010$), а наиболее удаленными – популяции *O.a.collium* и *O.a.karelini* ($D_{Reynolds} = 0,059$).

Таблица 2. Общая информация об использованных в исследовании микросателлитных локусах

	Локус	Число аллелей	Длина аллели	H_o	H_e
1	BM1225	13	225–265	0.63	0.66
2	BM4505	11	239–275	0.48	0.55
3	BM4513	16	131–161	0.71	0.73
4	BM848	22	201–243	0.75	0.83
5	MAF209	5	109–119	0.20	0.21
6	MAF36	13	84–116	0.72	0.74
7	MAF64	2	121–125	0.50	0.46
8	URB038	4	166–174	0.69	0.67
9	AE16	9	82–98	0.63	0.66
10	BMC1222	4	288–294	0.19	0.23
11	CP26	19	123–165	0.69	0.72
12	FCB266	13	82–106	0.63	0.65
13	TGLA126	11	112–144	0.54	0.54
14	TGLA387	12	129–153	0.68	0.70

Продолжение таблицы 2

15	ARO28	3	257–273	0.50	0.47
16	McM64	2	149–151	0.41	0.40
17	TGLA10	5	159–171	0.40	0.38
18	OarCP26	4	132–154	0.52	0.50
19	OarHH35	3	111–123	0.55	0.53
20	McM527	4	162–168	0.60	0.53
21	McM152	2	137–139	0.42	0.40
22	OarHH62	2	106–108	0.35	0.33
23	OarJMP29	2	120–122	0.51	0.50
24	OarJMP58	2	136–142	0.54	0.46
25	BM4630	5	154–162	0.74	0.72

Таблица 3. Генетические дистанции между изучаемыми популяциями выше диагонали – значения стандартных генетических дистанций по Нен - D_s , ниже - значения $D_{Reynolds}$

	<i>O.a.collium</i>	<i>O.a.littledalei</i>	<i>O.a.littledalei</i> (гр. Гор Арганаты)	<i>O.a.littledalei</i> (Чу-Илийская гр.)	<i>O.a.nigrimontana</i>	<i>O.a.karelini</i>
<i>O.a.collium</i>	-	0.093	0.137	0.148	0.169	0.210
<i>O.a.littledalei</i>	0.023	-	0.139	0.143	0.192	0.151
<i>O.a.littledalei</i> (гр. Гор Арганаты)	0.040	0.039	-	0.053	0.183	0.149
<i>O.a.littledalei</i> (Чу-Илийская гр.)	0.036	0.041	0.010	-	0.171	0.160
<i>O.a.nigrimontana</i>	0.045	0.057	0.048	0.055	-	0.168
<i>O.a.karelini</i>	0.059	0.041	0.040	0.051	0.046	-

На основании данных, полученных при анализе RAPD-маркеров и 25 микросателлитных локусов геномной ДНК представителей рода *Ovis* и проведенного кластерного анализа была построена консенсусная дендрограмма генетического сходства, согласно которой все исследованные экземпляры горных баранов и архаров подразделяются на 4 основные генетически различающиеся группы (рис. 2).

Первая из них обозначена нами как группа “карелини”. В нее входит представитель тяньшаньского подвида *O.a. karelini*, один из двух исследованных экземпляров *O.a. littledalei*, один из экземпляров Чу-Илийских архаров и экземпляр, полученный в горах Арганаты. Две другие группы - группа “коллиум” – формируют пред-

ставители *O.a. collium* и по одному экземпляру Чу-Илийских архаров и барана Литтльдаля. Кроме того, нами было показано, что при четко кластеризуемых генетических различиях между *O.a. collium* и *O.a. karelini*, представители *O.a. littledalei* из Джунгарского Алатау, группировки, обитающие в Чу-Илийских горах и горах Арганаты, не обнаруживают каких-либо характерных отличий от вышеназванных подвидов, что указывает на возможное гибридное происхождение этих группировок. Еще одну независимую группу, близкую к группе «коллиум», формирует *O.a. nigrimontana*. Эти данные были подтверждены и результатами анализа матрицы генетических различий методом многомерного шкалирования (рис. 3 А и Б). Как видно из представ-

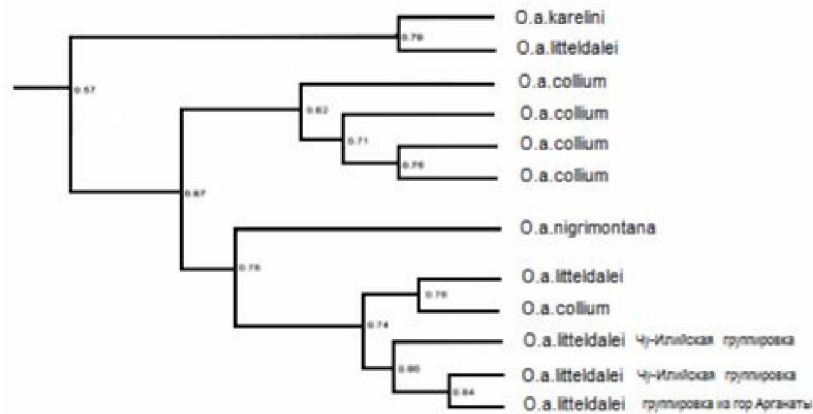
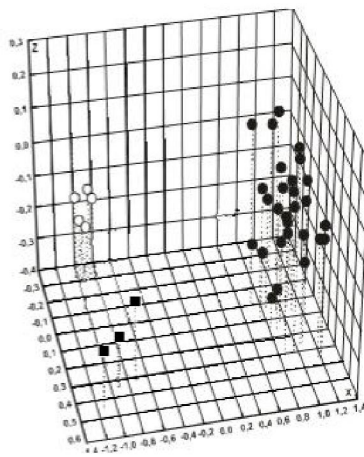


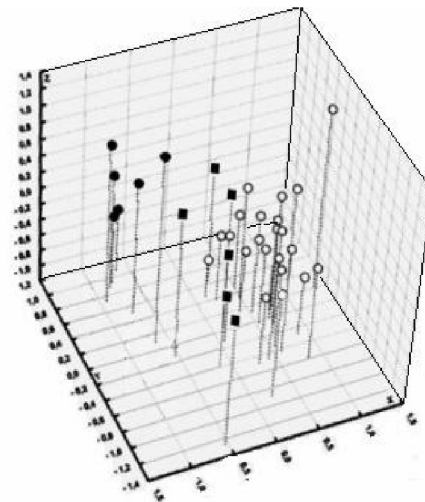
Рис. 2. Консенсусная дендрограмма генетического сходства, построенная на основании исследования полиморфизма 25 микросателлитных локусов и RAPD-маркеров ДНК горных баранов

ленных рисунков, популяции *O. a. collium*, *O. a. karelini*, *O. a. nigrimontana*, выявившие наиболее различающиеся попарные значения генетических дистанций, объединяются в три отдельные группы.

Представители же *O. a. litteldalei* не формируют отдельной группы, а входят как в группу “коллиум”, так и в группу “карелини”.



А



Б

Рис.3. А - Распределение популяций *O. a. collium* (черные кружки), *O. a. karelini* (белые кружки), *O. a. nigrimontana* (черные квадраты); Б - *O. a. collium* (белые кружки), *O. a. karelini* (черные кружки), *O. a. litteldalei* (серые квадраты) методом многомерного шкалирования

Таким образом, полученные нами данные говорят о высокой генетической гетерогенности изученных популяций. И свидетельствуют о том, что предпринимающиеся некоторыми авторами попытки объединения в одну группу казахстанского и тьянь-шаньского архаров являются преждевременными и не до конца обоснованными [6].

Заключение. Проведенные исследования позволили получить новые данные о полиморфиз-

ме геномной ДНК представителей отдельных популяций горных баранов, их систематическом статусе и сложных филогенетических связях внутри рода *Ovis*.

Изучение полиморфизма геномной ДНК горных баранов играет существенную роль в выяснении одного из сложнейших вопросов систематики млекопитающих и имеет безусловное практическое значение для мероприятий, направлен-

ных на сохранение и поддержание численности этих редких животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // Журнал Общей биологии, 2004, т.65, №4, с.278-305
2. Frances E. Arrighi, Janet Bergendahl Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues // Experimental Cell Research 1968. № 50. P.47-53.
3. Мельникова М.Н., Гречко В.В., Медников Б.М. Исследование полиморфизма и дивергенции геномной ДНК на видовом и популяционном уровнях (на примере ДНК пород домашних овец и диких баранов) // Генетика. 1999. Т.37. № 9. С.1129-1137.
4. Uzun M., Gutierrez-Gil B. genetic relationships among Turkish sheep // Genet.Sel.Evol. 2006, 38, pp.513-524
5. Ней М. Генетические расстояния и молекулярная таксономия // Вопросы общей биологии. 1981. Т.4. С.7-18.
6. Orlov V.N. Open questions of infraspecific taxa diagnosis of wild sheep *Ovis ammon* // Methods in Molecular Biology. 2001. V.45. P.345-352.

Резюме

Тау текелердің популяциялық ерекшеліктерінің молекула-генетикалық талдауы өткізілді. Қазақстандағы тау текелердің және арқардың 6 популяцияларының ішінде 52 өкілдерінің генотиптік ДНК 25 микросателлиттік локустар зерттелінді. *Ovis* топтың ішінде күрделі филогенетикалық өзара қатыстықтар айқындалды олардың кейбір өкілдерінің жүйелік мәртебесі дәлелденді. Тау текелердің зерттеуі кезінде популяция арасындағы айырмашылығын анықтау үшін random-праймерлер көмегі қолданылуы зерттелінген. Популяция арасындағы ерекшеліктерін анықтау үшін өте жоғары көрсеткіш праймерлер анықталған.

Summary

Genetic relationships among Kazakh sheep breeds were analysed on the basis of RAPD-analysis and 25 microsatellite markers. Phylogenetic analysis based on the estimation of genetic distances revealed the closest relationships for the *O.a.karelini*, *O.a.litteldalei*, *O.a.collium*, which were clearly differentiated from the others in the dendrogram. Our pattern was completely confirmed by results from the Factorial Correspondence Analysis.