

УДК 574.17.5:598.13

О. С. МАЗУРОВА, Н. А. АЙТХОЖИНА

RAPD-АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ГОРНЫХ БАРАНОВ

Приведены экспериментальные данные о RAPD-полиморфизме геномной ДНК, представителей рода *Ovis*, показана возможность использования random-праймеров для анализа межпопуляционных различий горных баранов. Составлены бинарные матрицы и построены дендрограммы генетического сходства изученных групп животных.

Введение. В настоящее время для решения спорных вопросов систематики и филогении в различных таксономических группах используются молекулярно-генетические методы. Анализ геномного полиморфизма стал сегодня необходимой частью любого филогенетического таксономического исследования. В распоряжении геносистематиков есть подходы, позволяющие вести исследование на самых разных уровнях – от индивидуумов и популяций, до отрядов и надотрядных категорий [1].

Наибольшее распространение в геносистематике получили ДНК-маркеры, основанные на полимеразной цепной реакции. Одним из таких методов является RAPD-PCR с одним и двумя праймерами. Этот метод прост в исполнении, требует малое количество ДНК, и при его использовании нет необходимости в радиоактивных материалах, что и объясняет его широкое распространение.

В задачи нашего исследования входило изучение межпопуляционного полиморфизма ядерной ДНК горных баранов *O.a. collium*, *O.a. litteldalei*, распространенных на территории Казахстана методом RAPD-PCR.

Эта группа животных интересна сразу с нескольких позиций. Во-первых, данная таксономическая группа вообще изучена достаточно слабо. Кроме того, многие представители рода *Ovis* уже давно признаны редкими и исчезающими и занесены в Красную Книгу и поэтому любые исследования, направленные на сохранение и увеличение их численности являются актуальными и необходимыми сегодня. Не меньший интерес эта группа представляет и с точки зрения решения фундаментального вопроса их систематики и таксономии. Многочисленные попытки дифференцировать горных баранов на основе тради-

ционных для систематики критериев не принесли однозначных результатов. Решение же этой проблемы имеет как теоретическую, так, безусловно, и практическую значимость, как для повышения эффективности природоохранных мероприятий, так и для восстановления численности этих редких животных [2].

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили 44 образца биологического материала, полученных от представителей различных подвидов и популяций горных баранов, обитающих на территории Казахстана.

Из лимфоцитов крови препараты ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. При выделении ДНК из фиксированных в этаноле семенников использовали модифицированный метод Арриджи [3].

Для RAPD-анализа использовали одиночные случайные и парные олигонуклеотидные праймеры. Реакцию амплификации проводили в объеме 25 мкл 0.01М буфера трис-HCl, pH 8.3, содержащего 0.05 М KCl, смесь четырех dNTP (0.1 - 0.2 мМ), MgCl₂ (1.5 - 9 мМ), 0.01% желатина, олигонуклеотидный праймер или смесь праймеров (0.25 - 0.5 мкМ), ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus* (0.5 - 1 ед/пробу) и 1мкл ДНК (8 нг/мкл). Реакцию с использованием одиночного случайного праймера проводили по циклу: денатурация (94 °С, 1 мин), отжиг (40 °С, 1 мин) и полимеризация (72 °С, 2 мин). Число циклов - 35. При использовании двух олигонуклеотидных затравок реакция амплификации проходила по двум циклам: 1-й цикл – денатурация (94 °С, 0,7 мин), отжиг (50 °С, 0,5 мин), полимеризация (72 °С, 0,5 мин); 2-й цикл - денатурация (94 °С, 0,7 мин), отжиг (60 °С, 0,5 мин), полимеризация (72 °С, 0,5 мин). Проводили 3 цикла первого типа и 32 – второго. Схема приготовления и смешивания

ингредиентов реакционной смеси соответствовала опубликованным рекомендациям [4].

Продукты амплификации разделяли в 6 или 8% не денатурирующем полиакриламидном геле с использованием буфера TBE (18 mM трис-HCl, pH 8.3, 18 mM борная кислота, 0.4 mM EDTA). Гель окрашивали бромистым этидием (0.05%), промывали водой, просматривали в ультрафиолетовом свете на геле-документирующей системе фирмы BIORAD (USA) и фиксировали в цифровом формате. Анализ полученных электрофореграмм проводился визуально: учитывались все полосы поддающиеся разрешению.

Результаты и обсуждение. Ранее нами был проведен скрининг одиночных случайных праймеров и сочетаний олигонуклеотидов. Всего в работе для решения поставленной задачи была исследована возможность использования 30 *gandot*-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 ампликонов и выявлявших высокий уровень межпопуляционных различий изучаемых животных.

На рис. 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 выявить достаточно высокий уровень межпопуляционного полиморфизма. Число амплифициро-

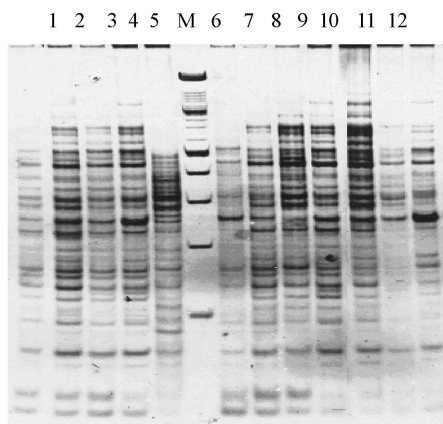


Рис. 1. а) Электрофореграмма распределения продуктов амплификации ДНК горных баранов с праймером 3; М – маркер молекулярной массы λ /Pst

ванных фрагментов с этим олигонуклеотидом колеблется от 14 до 31 и они равномерно распределяются в зоне от 260 до 2900 пн.

По результатам анализа электрофореграмм были построены матрицы генетических расстояний. Первоначально строилась суммарная матрица данных типа «объект-признак», где присутствие полосы обозначалось «1», отсутствие – «0». Такая матрица строилась для каждой популяции с учетом результатов амплификации всех матриц, полученных из биологического материала представителей данной популяции. 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 [5]. Для построения филогенетических древ использовался метод невзвешенного попарного среднего (UPGMA).

По данным проведенного кластерного анализа все исследованные экземпляры горных баранов и архаров подразделяются на 3 основные генетически различающиеся группы (рис. 2).

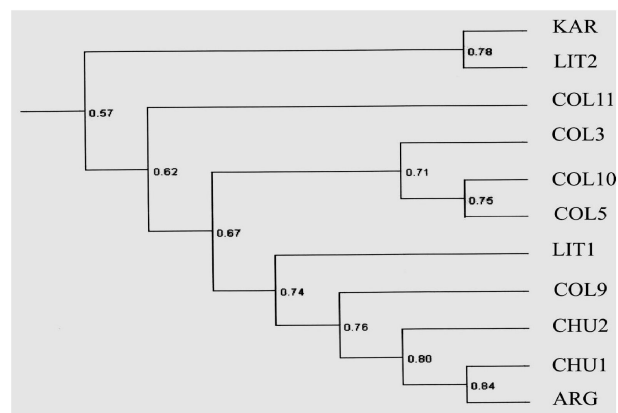


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства, построенная на основании изменчивости RAPD-фрагментов у исследованных групп животных

Первая из них обозначена нами как группа “карелини”. В нее входит представитель тяньшанского подвида *O.a. karelini*, один из двух исследованных экземпляров *O.a. littledalei*, один из экземпляров Чу-Илийских архаров и экземпляр, полученный в г. Арганаты. Две другие группы – группа “коллиум” – формируют представители *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 обитающей в Чу-Илийских горах и горах Арганаты не обнаруживают каких-либо характерных отличий от вышеуказанных подвидов, что указывает на возможное гибридное происхождение этих группировок.

В процессе работы нами было также показано, что все праймеры, которые давали устойчивые картины межпопуляционных различий в наборе RAPD-продуктов, выявляли также и внутривидовую гетерогенность казахстанского архара. Эта гетерогенность не совпадала с территориальным распределением исследованных животных и, скорее всего, отражала высокий уровень индивидуальной изменчивости, присущий всем представителям рода *Ovis*. Следовательно, при использовании этой технологии для выяснения степени генетического родства между различными подвидами и группировками горных баранов, оценка внутривидовой полиморфизма ДНК является одной из основных задач. Вследствие этого, имеющиеся в литературе выводы, которые были сделаны в результате анализа единичных образцов ДНК горных баранов, нельзя считать аргументированными, а предпринимавшиеся ранее попытки объединить казахстанского и тьяншанского архаров в одну группу с памирским бараном *O.a.polii* преждевременными [6].

Заключение. Таким образом, можно констатировать, что проведенные исследования позволили получить новые данные о полиморфизме 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 совершенствования природоохранных мероприятий, направленных 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. Ляпунова Е.А., Банч Т.Д., Воронцов Н.Н., Хоффман Р.С. Хромосомные наборы и систематическое положение барана Северцова // Зоологический журнал. 1997. Т. 76, № 9. С. 1083-1093.
3. Frances E. Arrighi, Janet Bergendahl Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues // Experimental Cell Research 1968. № 50. P. 47-53.
4. 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.
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 зерттеуі кезінде популяция арасындағы айырмашылығын анықтау үшін random-праймерлер көмегі қолдануы зерттелінген. Популяция арасындағы ерекшеліктерін анықтау үшін өте жоғары көрсеткіш праймерлер анықталған.

Summary

The opportunity of using the random – oligonucleotides for interplanetary differences of the mountainous rams has been investigated. The primers, which the greatest level of interplanetary differences for tested animals, were selected.

Институт молекулярной биологии
и биохимии им. М. А. Айтхожина
МОН РК, г. Алматы

Поступила 10.10.07г.