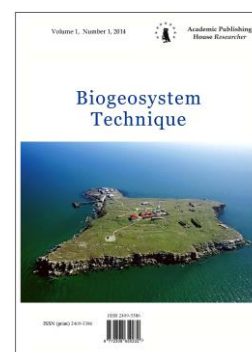


Copyright © 2017 by Academic Publishing House Researcher s.r.o.



Published in the Slovak Republic
Biogeosystem Technique
Has been issued since 2014.
ISSN: 2409-3386
E-ISSN: 2413-7316
2017, 4(1): 9-24

DOI: 10.13187/bgt.2017.1.9
www.ejournal19.com



UDC 539.1.047:575.224

Spectra of ISSR-PCR Markers in Assessments of the Intrinsic Genetic Differentiation of the Karachai Horse

Tatiana V. Golik ^a, Irina I. Gaponova ^a, Eugenia A. Knyaseva ^a, Timur A. Erkenov ^a,
Tatiana T. Glazko ^{a, b, *}

^a Russian State Agrarian University – MAA named after K.A. Timiriyev, Moscow,
Russian Federation

^b Centre of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies RAAS, Moscow,
Russian Federation

Abstract

The gene pool of local domestic breeds is continuously decreasing, therefore the biodiversity of animals with high adaptive potential is also decreasing. Problem solving requires the development of methods that are able to identify the unique characteristics of such aboriginal animals and preserve the genetic resources of farm mammal species. In this paper we have analyzed the genotypes of Karachai breed horses from four different farms ("Akhtamas", "Argamak", "Ikar", "Karplemkhoz") at 39 loci using genotyping methods for amplification products of fragments of genomic DNA of above mentioned horses flanked by inverted repeats of microsatellite loci (AG) 9C, (GA) 9C and (GAG) 6C using the Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR-PCR markers). It has been made the analysis of the genotypes of horses with different skin colors. The results shows that black-brown (dark-bay) horses have a more unique genetic structure in comparison with the horses of the bay and black color and have their own peculiarities in origin that distinguish them from other horses of the Karachai breed. The obtained data are indicating a sufficiently high degree of consolidation of the studied group of animals. It was found that, on average, the index of genetic identity between these animals is 0.8105. The spectra of the amplification products differed by increased polymorphism for the horses from the limited liability company Plemreproduktor "Ikar". The horses from the "Karplemkhoz" farm possessed the greatest consolidation.

Keywords: Karachai breed horses, the spectra of amplification products, genetic differentiation, ISSR-PCR markers, consolidation.

1. Введение

РФ является одной из стран, которая богата генотипическим разнообразием животных сельскохозяйственных видов, так как владеет большой территорией, следовательно, имеет место большое разнообразие эколого-географических условий разведения животных. Во многих ранних работах отмечалось, что многие отечественные породы превосходят

* Corresponding author

E-mail addresses: tglazko@rambler.ru (T.T. Glazko)

зарубежные по своей приспособленности к условиям обитания, долголетию, устойчивости к различным заболеваниям и т.д. (Kalashnikov et al., 2011).

По данным FAO, в настоящее время особую актуальность приобретают вопросы, связанные с сохранением генетических ресурсов местных пород животных сельскохозяйственных видов, их генетического и фенотипического разнообразия (FAO, 2015). Это связано с тем, что местные (аборигенные) породы, в частности, лошади обладают уникальным адаптивным потенциалом. Они могут проживать в районах неблагоприятных по климатическим и географическим условиям, с минимальным использованием пищевых ресурсов и человеческого труда (Храброва и др., 2012). Особый интерес в настоящее время приобретают породы лошадей, адаптированные к высокогорной гипоксии, поскольку обнаружено, что некоторые механизмы такой адаптации являются общими для домашней лошади и человека (Hendrickson, 2013). Генетическая основа такой адаптации животных к окружающей среде (в частности к высокогорной гипоксии) все еще изучается (Simonson et al., 2010). К одной из таких пород относится карачаевская лошадь, сохранение и усовершенствование которой требует подробного изучения ее генетической структуры, фенотипического разнообразия.

Принято считать, что родина карачаевской породы – верхнее течение реки Кубани и плоскогорья водораздела Черного и Каспийского морей. Прямые свидетельства о прилитии карачаевским лошадям крови других пород отсутствуют, но в их облике просматриваются «следы» степных коней (скорее всего, ногайских) и влияние пород Востока. Считается, что порода сформировалась к XV–XVI вв. (Парфенов и др., 2005).

Достоинствами карачаевской породы лошадей являются низкорослость, выносливость, работоспособность, неприхотливость в содержании и врожденная устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды. Такая высокая адаптивная способность данной породы лошадей связана с тем, что становление данной породы, происходило в суровых условиях, для которых характерны сложный горный ландшафт, резкие перепады температур и высокогорная гипоксия. Еще одним важным фактором является высокая плодовитость данной породы, зажеребляемость у них происходит в 86–92 % случаев, а в 83–89 % рождаются здоровые жеребята.

Карачаевскую породу лошадей также можно назвать универсальной породой, потому что в настоящее время ее используют в сельском хозяйстве, спорте, туризме, транспортировке и военной службе (Парфенов, Хотов, 2010).

С точки зрения генетики масти, карачаевская порода лошадей имеет две основные масти: вороную и гнедую. Принято считать, что караковая масть является переходной между вышеуказанными. Караковая масть выглядит как вороная с подпалинами, которые должны быть хорошо выраженными на черном фоне. По данным литературы известно, что у домашней лошади древней мастью является гнедая по сравнению с вороной (Ludwig et al., 2009) однако обнаружено, что у древних лошадей с относительно низкой частотой встречалась и другие масти. (Pruvost et al., 2011).

Особенности генетической структуры карачаевской лошади в настоящее время остаются недостаточно исследованными. Поэтому для выяснения популяционно-генетических характеристик групп карачаевской лошади в настоящей работе выполнено полилокусное генотипирование (геномное сканирование) с использованием оценок полиморфизма участков геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами фрагментов микросателлитов (AG)₉C, (GA)₉C, (GAG)₉C и групп карачаевской породы лошадей в 4-х хозяйствах: «Ахтамас», «Аргомак», «Икар» и «Карплемхоз» (Карачаево-Черкесская Республика).

2. Материалы и методы

В исследовании были использованы образцы крови карачаевской породы лошадей из 4-х различных хозяйств.

ООО Племярепродуктор «Ахтамас» расположено в станице Сторожевой Зеленчукского района Карачаево-Черкесской республики. В анализ вошли 47 кобыл и 6 жеребцов 1998-2008 годов, а также кобылки 2014 года (47 голов в возрасте 1 год).

ООО «Аргомак» расположено в селе Хасаут, Малокарачаевского района, КЧР. В анализ вошли 15 кобыл и 2 жеребца 2002-2012 годов, а также кобылки 2015 года (15 голов в возрасте 1 год).

ООО Племярепродуктор «Икар» Зеленчукского района, КЧР. В анализ вошли 19 кобыл и 4 жеребца 2001-2011 годов, а также кобылки 2015 года (17 голов в возрасте 2-х лет).

ООО «Карплемхоз» Джегутинского района, КЧР. В анализ вошли 5 жеребцов и 30 кобыл 2001-2010 годов, а также кобылки 2014 года (30 голов в возрасте 1 год).

В общей сложности выборка составила 240 животных. В процессе анализа все животные были разделены на группы в зависимости от хозяйства, пола, возраста и масти животного.

Метод типирования групп крови лошадей находит широкое практическое применение. Использование метода генотипирования по группам крови подробно рассматривается в работах К. Стомонта. (Stormont, 1951, 1958, 1967; Stormont, Morris, 1992). Исследование систем групп крови лошадей разных пород проводится в России более 4-х десятилетий. Формирование информационной базы во Всероссийском институте коневодства особенно важно для малочисленных популяций, находящихся на грани исчезновения, так как способствует развитию методов генетически обоснованных подходов к сохранению и совершенствованию их генофондов.

Образцы крови для анализа были получены из яремной вены животных, затем их помещали в индивидуальные пробирки с ЭДТА. На пробирках указывали № животного и пол. Полученные пробы хранились в холодильнике при температуре 70 °С. Геномную ДНК из образцов крови выделяли с помощью коммерческого набора реагентов «ДНК-Экстран-1» (Синтол, Россия) в соответствии с рекомендациями, которые прилагает производитель. Процесс выделения включал лизис эритроцитов и ядер клеток, осаждение ДНК изопропанолом и промывку 70 % этанолом с окончательным растворением в бидистиллированной воде или буфере TE. Концентрацию ДНК определяли в растворе при помощи спектрофотометра.

Для животных сельскохозяйственных видов более простым и эффективным методом полилокусного генотипирования служит использование фрагментов микросателлитных локусов в качестве ПЦР-праймеров. (Бардуков и др., 2014).

В качестве праймеров для полилокусного генотипирования по фрагментам ДНК, фланкированными инвертированными повторами микросателлитов (Inter-Simple Sequence Repeats – ISSR-маркеры) применялись динуклеотидные микросателлиты с якорными нуклеотидами – (AG)₉C, (GA)₉C, а также тринуклеотидный микросателлит (GAG)₆C. Полилокусность ISSR-PCR-маркеров позволяет рассчитывать на выявление их комбинаций, тесно связанных с особенностями происхождения, отбора и фенотипической дифференциацией групп животных. (Глазко и др., 2013). Микросателлиты характеризуются высокой вариабельностью, кодоминантным характером наследования, высокой степенью полиморфизма, известной локализацией в геноме и широко используются для определения генетической структуры пород и популяций, изучения происхождения и микроэволюции пород, проведения генетического мониторинга в породах с целью сохранения аллелофонда малочисленных пород, усовершенствования методов разведения и т.д. (Храброва и др., 2012).

Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 20 мкл с использованием коммерческого набора реагентов ПЦР-РВ (Синтол, Россия) по методу (Zietkiewicz et al., 1994). Состав реакционной смеси: ДНК – 2 мкл (около 150 нг), дезоксинуклеозидтрифосфаты (2,5 мМ) – 2 мкл, 10-кратный ПЦР буфер – 2 мкл, MgCl₂ (25 мМ) – 2 мкл, Taq ДНКполимераза с ингибирующими активностью фермента антителами (5 Е/мкл) – 0,2 мкл, праймер (10 пкмоль/реакцию) – 2 мкл, деионизированная вода – 10 мкл. Амплификация выполнялась по следующей программе: первичная денатурация (t = 94 °С, 2 мин.); денатурация (t = 94 °С, 30 с.), отжиг (t = 55 °С, 30 с.), элонгация (t = 72 °С, 2 мин.) – 35 циклов; финальная элонгация (t = 72 °С, 10 мин.), ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технологии, Россия). Продукты амплификации разделяли в горизонтальном 1,5 % агарозном геле в TBE-буфере. Окрашивание гелей проводили бромистым этидием концентрацией 0,5 мкг/мл. Фрагменты ДНК визуализировали в УФ свете при помощи трансиллюминатора УВТ-1 (Биоком, Россия) с использованием системы гель-документации VITRAN-PHOTO (Биоком, Россия). Размеры

фрагментов ДНК определяли при помощи маркера молекулярных масс 100 bp+1.5 Kb+3 Kb (12 фрагментов от 100 до 3000 bp) M27 (СибЭнзим, Россия).

На каждый из полученных спектров продуктов амплификации были построены матрицы, отражающие присутствие или отсутствие в них конкретных ампликонов. Затем полученные данные обрабатывались в программах MS Excel и TFPGA. Каждый ампликон спектра рассматривали как один локус ДНК. Полиморфизм по данному локусу оценивали по наличию или отсутствию ампликона соответствующей длины в спектрах с использованием специализированной программы TFPGA.

Расчет индекса Polymorphic Information Content (PIC) выполняли по формуле для диаллельных локусов, для которых $PIC=2f(1-f)$, где f – частота одного из двух аллелей. Согласно Botstein и др. (1980) локусы со значением $PIC>0,500$ являются высокополиморфными, со значением PIC в пределах 0,250–0,500 – умеренно полиморфными, а если $PIC<0,250$, то маркеры низкополиморфные.

Поскольку используемые нами маркеры ISSR-PCR, фланкированные инвертированными повторами микросателлитов, имеют доминантный характер проявления по присутствию продукта амплификации, f рассчитывали по формуле: $f = R^{1/2}$, где R – частота встречаемости животных среди исследованных, у которых в спектрах продуктов амплификации отсутствовал фрагмент ДНК данной длины. Значение R рассматривалось как доля гомозигот по рецессивному аллелю. (Эркенов, 2015). На основании данных о распределении ампликонов по спектрам амплификации по методу Нея (Nei, 1972) были определены генетические дистанции между исследуемыми лошадьми из разных хозяйств. На основании данных генетических дистанций проведен кластерный анализ с использованием метода усреднения расстояний и построены дендрограммы как наиболее наглядный способ выражения взаимосвязей между животными (Ольховская и др., 2011).

3. Результаты и обсуждение

По результатам выполненного анализа, были получены следующие данные. Спектры продуктов амплификации с использованием в качестве праймеров последовательностей (AG)₉C и (GA)₉C (Табл. 1-4, Рис. 1, 2) незначительно отличались друг от друга, как по количеству получаемых ампликонов, их длинам (в парах нуклеотидов), так и по их полиморфизму.

В спектре продуктов амплификации, полученных при использовании в качестве праймера последовательности (GA)₉C, выявлено суммарно в 4-х исследованных хозяйствах 15 фрагментов ДНК. Каждый из этих фрагментов рассматривался как отдельный локус. В двух хозяйствах «Икар» и «Аргомак» – наблюдали повышенный уровень полиморфизма относительно двух других хозяйств (Табл. 1). Полиморфное информационное содержание (PIC) спектров продуктов амплификации, полученных при использовании в ISSR-PCR последовательностей (GA)₉C, в «Икаре» в два раза выше, чем в «Ахтамасе», и в десять раз больше, чем в «Карплемхозе», примерно также исследованные хозяйства различались и по длинам полиморфных локусов (ДПЛ) (Табл. 2).

Таблица 1. Полиморфное информационное содержание (PIC) и доля полиморфных локусов (P) спектров продукции амплификации по праймеру (GA)₉C

Праймер (GA) ₉ C	«Икар»	«Ахтамас»	«Аргомак»	«Карплемхоз»
PIC	0,31	0,14	0,23	0,03
P,%	73	46	73	6

Таблица 2. Сравнительный анализ полиморфизма фрагментов ДНК по праймеру (GA)₉C в хозяйствах «Икар», «Ахтамас», «Аргомак» и «Карплемхоз»

П.н.	«Икар»	«Ахтамас»	«Аргомак»	«Карплемхоз»
1750-1700	-	-	-	-
1510-1490	+	-	+	-
1450-1400	+	-	+	-
1320-1300	+	-	+	-
1290-1250	+	+	+	-
1050-1000	+	-	+	-
980-950	+	-	+	-
900-870	-	-	-	-
820-790	+	-	+	-
760-720	+	+	+	-
640-590	+	+	+	-
580-550	+	+	+	+
550-530	-	+	+	-
520-490	+	+	-	-
400-380	+	+	-	-

«+»- полиморфизм по данному фрагменту ДНК; «-» – консервативный участок ДНК по данному фрагменту

Из полученных данных можно сделать вывод, что спектры праймера (GA)₉C наиболее полиморфны у лошадей из хозяйства «Икар». Спектры продуктов амплификации фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами этого праймера (ампликонов) хозяйства «Карплемхоз» максимально консервативны по сравнению с тремя другими хозяйствами. Наиболее консервативными ампликонами в хозяйстве «Икар» оказались 3 фрагмента спектра с длинами в 1750-1700, 900-870 и 550-530 пар оснований (п.о.) Наиболее консервативными фрагментами в хозяйстве «Ахтамас» являются ампликоны в районе длин 1750-1300, 1050-790 пар оснований (всего 8 локусов). Хозяйство «Аргомак» по данному праймеру практически не отличается от объединения «Икар». У животных из хозяйства «Карплемхоз» почти все фрагменты спектра консервативны, кроме одного в районе 580-550 п.о.

На дендрограмме, построенной на основании распределения у исследованных животных фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами (GA)₉C (Рис. 2), выделяется 2 основных крупных кластера, причем каждый из них разделяется на два подкластера. Кластерный анализ может быть использован для анализа тесноты связей между структурными единицами различных пород сельскохозяйственных видов животных (Литвинова, 2011). На дендрограмме четко выделяется подкластер с лошадьми из хозяйства «Карплемхоз», это, по-видимому, связано с высоким уровнем консолидированности в данном хозяйстве. Рядом располагается подкластер с животными из хозяйства «Ахтамас». Эти два хозяйства образуют один крупный кластер. Также стоит отметить, что в данный кластер входит караковый жеребец из хозяйства «Икар». Второй крупный кластер также делится на два подкластера, состоящих из двух хозяйств – «Икар» и «Аргомак». Объединение этих двух хозяйств в один общий кластер можно связать с тем, что у лошадей из данных объединений одинаковый ДПЛ = 73 %.

В спектрах ампликонов праймера (GAG)₆C выделяется 10 фрагментов ДНК (Табл. 5, 6). Наибольший полиморфизм спектров данного праймера выявлен в хозяйствах «Ахтамас» и «Икар». В этих двух племобъединениях уровень полиморфизма почти в 3-4 раза больше, чем в хозяйствах «Аргомак» и «Карплемхоз» (Табл. 5). Стоит отметить, что «Аргомак» по праймерам (AG)₉C и (GA)₉C отличается достаточно высоким уровнем полиморфизма.

Таблица 3. Полиморфное информационное содержание (PIC) и доля полиморфных локусов (P) спектров продукции амплификации по праймеру (AG)₉C

Праймер (AG) ₉ C	«Икар»	«Ахтамас»	«Аргомак»	«Карплемхоз»
PIC	0,26	0,08	0,12	0,05
P, %	64	21	35	14

Таблица 4. Сравнительный анализ полиморфизма фрагментов ДНК по праймеру (AG)₉C в хозяйствах «Икар», «Ахтамас», «Аргомак» и «Карплемхоз»

П.н.	«Икар»	«Ахтамас»	«Аргомак»	«Карплемхоз»
1750-1700	+	-	-	-
1510-1490	-	-	-	-
1450-1400	+	-	-	-
1390-1360	+	+	-	-
1250-1200	+	-	-	-
1110-1050	+	-	-	-
990-960	+	-	-	-
940-910	+	-	+	-
900-870	-	+	+	-
820-790	-	-	-	-
720-670	-	+	+	+
580-550	-	-	+	-
470-440	+	-	+	+
400-380	+	-	-	-

«+»- полиморфизм по данному фрагменту ДНК; «-» - консервативный участок ДНК по данному фрагменту

По праймеру (GAG)₆C самым полиморфным оказался участок в 980-950 п.о., полиморфизм по данному локусу встречается во всех хозяйствах кроме «Карплемхоза». Также достаточно полиморфными являются участок в 1060-1110 п.о. В целом можно отметить, что показатели P и PIC по данному праймеру меньше, чем по двум остальным.

На дендрограмме, построенной на основании расчета генетических расстояний по частотам встречаемости ампликонов спектров праймера (GAG)₆C (Рис. 3), выделяется два кластера: один включает в себя группы животных из всех 4-х хозяйств, второй – хозяйство «Икар» и гнедых жеребцов из «Ахтамаса». Первый кластер самый крупный и он делится на 2 подкластера, который в свою очередь также разделяются на подкластеры. На первом подкластере видно, что группы животных из хозяйств «Карплемхоз» и «Аргомак», а также часть животных из «Икара» и «Ахтамаса» идут ровной линией, что говорит о высокой консолидированности между ними. Интересно отметить, что в данный подкластер входит группа животных из «Ахтамаса» с караковой мастью и жеребцы из «Икара» также караковой масти.

В спектре продуктов амплификации праймера (AG)₉C было обнаружено 14 воспроизводимых локусов (Табл. 4), количество полиморфных из них отличалось в зависимости от хозяйства. Так в хозяйстве «Икар» было обнаружено 9 полиморфных локусов (с длинами в 1700-1750 пар оснований, 1450-1400 п.о., 1390-1360 п.о., 1250-1200 п.о., 1110-1050 п.о., 990-960 п.о., 940-910 п.о., 470-440 п.о. и 400-380 п.о.). «Ахтамас» 3 полиморфных локуса (1390-1360 п.о., 900-870 п.о. и 720-670 п.о.). В хозяйстве «Аргомак» было 5 полиморфных локусов (940-910 п.о., 900-870 п.о., 720-670 п.о., 580-550 п.о. и 470-440 п.о.). И наконец, в хозяйстве ООО «Карплемхоз» было выявлено 2 полиморфных локуса (720-670 п.о., 470-440 п.о.). При сравнении полученных результатов можно сделать вывод, что наиболее полиморфными являются локусы в 940-910 п.о., 900-870 п.о., 720-670 п.о., 470-440 п.о., так как они встречаются наиболее часто как минимум в двух хозяйствах. По праймеру (GA)₉C было выявлено 15 воспроизводимых локусов, в хозяйствен «Икар»

полиморфными были 12 из них, а консервативными только 3, с длинами в 1750-1700 п.о., 900-870 п.о., 550-530 п.о. В «Ахтамасе» полиморфных локусов было 7 (1290-1250 п.о., 760-720 п.о., 640- 590 п.о., 580- 550 п.о., 550-530 п.о., 520-490 п.о. и 400-380 п.о.). ООО «Аргомак» имел 11 полиморфных локусов и 4 консервативных с длинами в 1750-1700 п.о., 900-870 п.о., 520-490 п.о. и 400-380 п.о. «Карплемхоз» имел всего один полиморфных локус с длиной в 580-550 п.о. По данному праймеру наиболее полиморфными являются локусы с длинами в 520-490 п.о. и 400-380 п.о., полиморфизм которых наблюдался почти во всех четырех хозяйствах.

По данным P (%) и PIC (Табл. 3) можно сделать вывод, что самый высокий уровень полиморфизма наблюдается в хозяйстве «Икар» – 64 %, а это почти в 3 раза больше, чем в хозяйствах «Ахтамас» (21%) и «Карплемхоз». Самый низкий уровень полиморфизма в хозяйстве «Карплемхоз» – всего 14 %. P (%) в хозяйстве «Аргомак» имеет среднее значение 35 %.

Построенная на основании сравнения частот встречаемости ампликонов разной длины в спектрах праймера (AG)₉C дендрограмма (Рис. 1) включает два кластера.

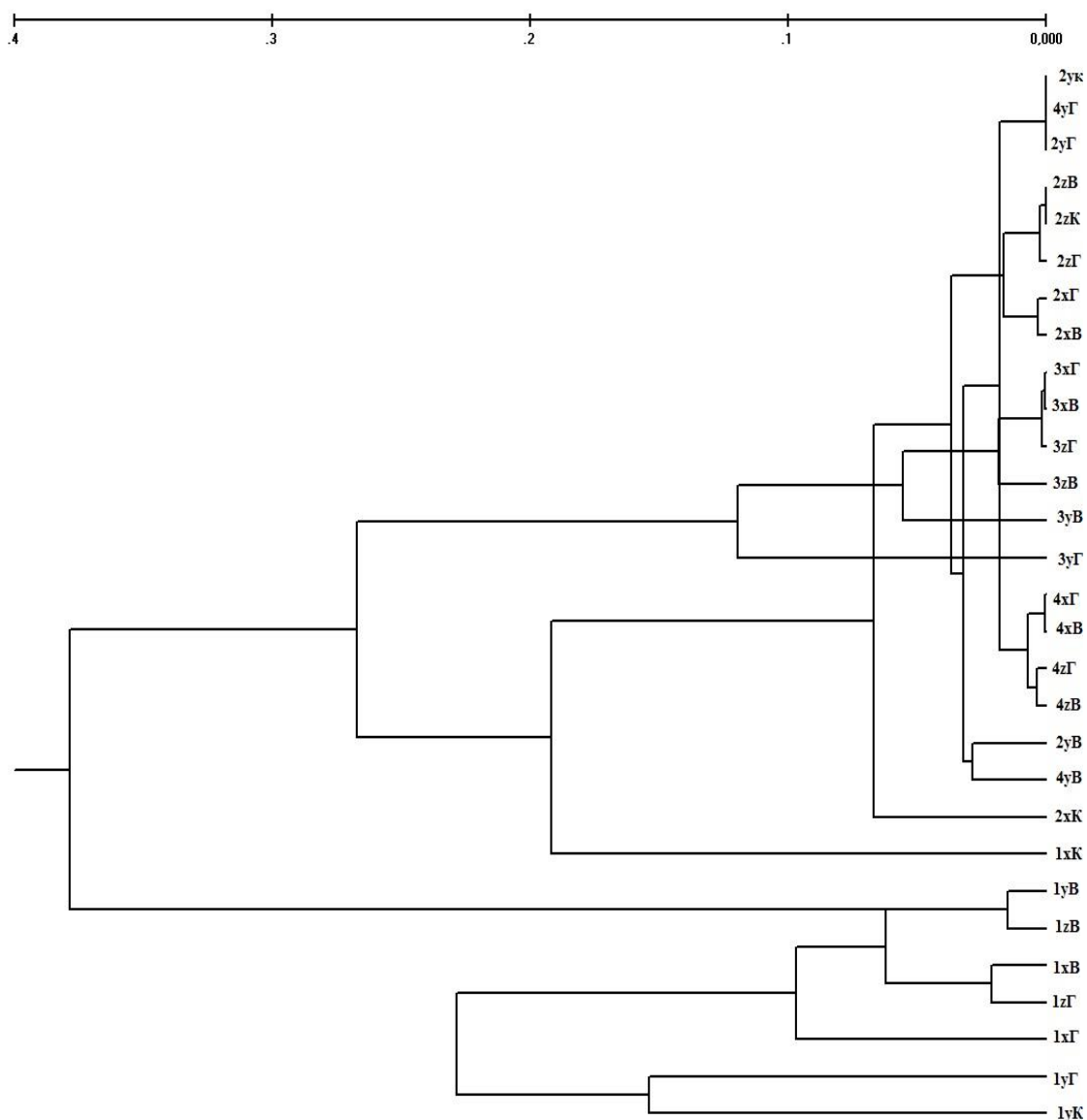


Рис. 1. Дендрограмма генетических взаимоотношений, построенных на основании генетических дистанций у лошадей карачаевской породы лошадей в четырех различных хозяйствах по праймеру (AG)₉C

1 – «Икар», 2 – «Ахтамас», 3 – «Аргомак», 4 – «Карплемхоз»; y – жеребец, x – кобыла, z – кобылка; Г – гнедая масть, В – вороная масть, К – караковая масть

Первый кластер, объединяет три хозяйства: «Ахтамас», «Аргомак» и «Карплемхоз»; второй – это отделившееся хозяйство «Икар», причем в первый кластер входит группа караковых кобыл из хозяйства «Икар».

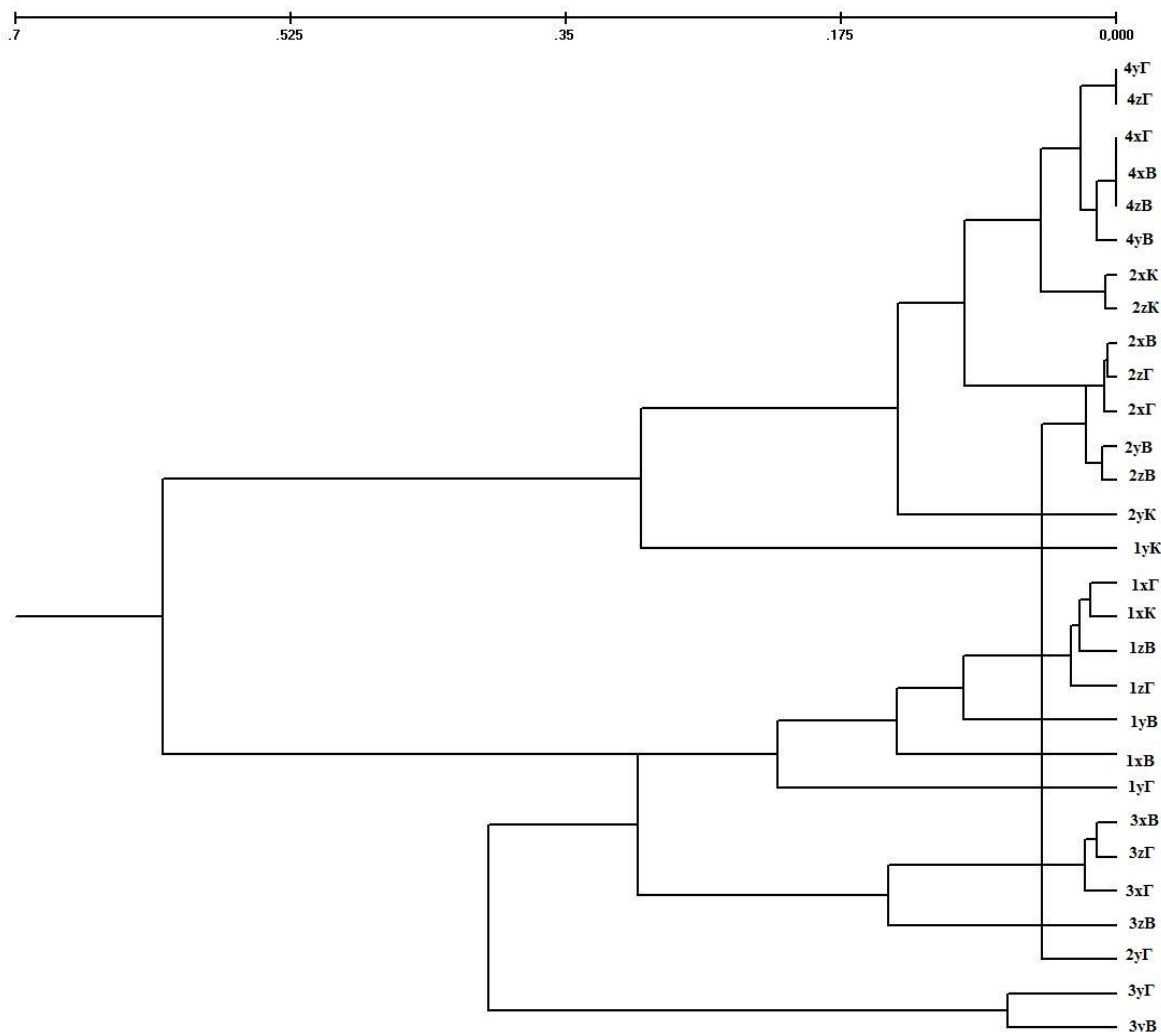


Рис. 2. Дендрограмма генетических взаимоотношений, построенных на основании генетических дистанций у лошадей карачаевской породы лошадей в четырех различных хозяйствах по праймеру $(GA)_9C$

1 – «Икар», 2 – «Ахтамас», 3 – «Аргомак», 4 – «Карплемхоз»; у – жеребец, х – кобыла, z – кобылка; Г – гнедая масть, В – вороная масть, К – караковая масть.

Таким образом, выполненный анализ свидетельствует о высокой эффективности использования ISSR-PCR маркеров для оценки консолидированности групп лошадей с использованием в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции участков микросателлитов с коровым мотивом AG, GA и GAG. Подбор молекулярно-генетических маркеров для полилокусного генотипирования (геномного сканирования) может отличаться в зависимости от цели исследования. Для контроля происхождения и консолидированности пород и внутривидовых групп более эффективным будет применение ISSR-PCR маркеров. (Эркенов и др., 2015).

Таблица 5. Полиморфное информационное содержание (PIC) и доля полиморфных локусов (P) спектров продукции амплификации по праймеру $(GAG)_6C$

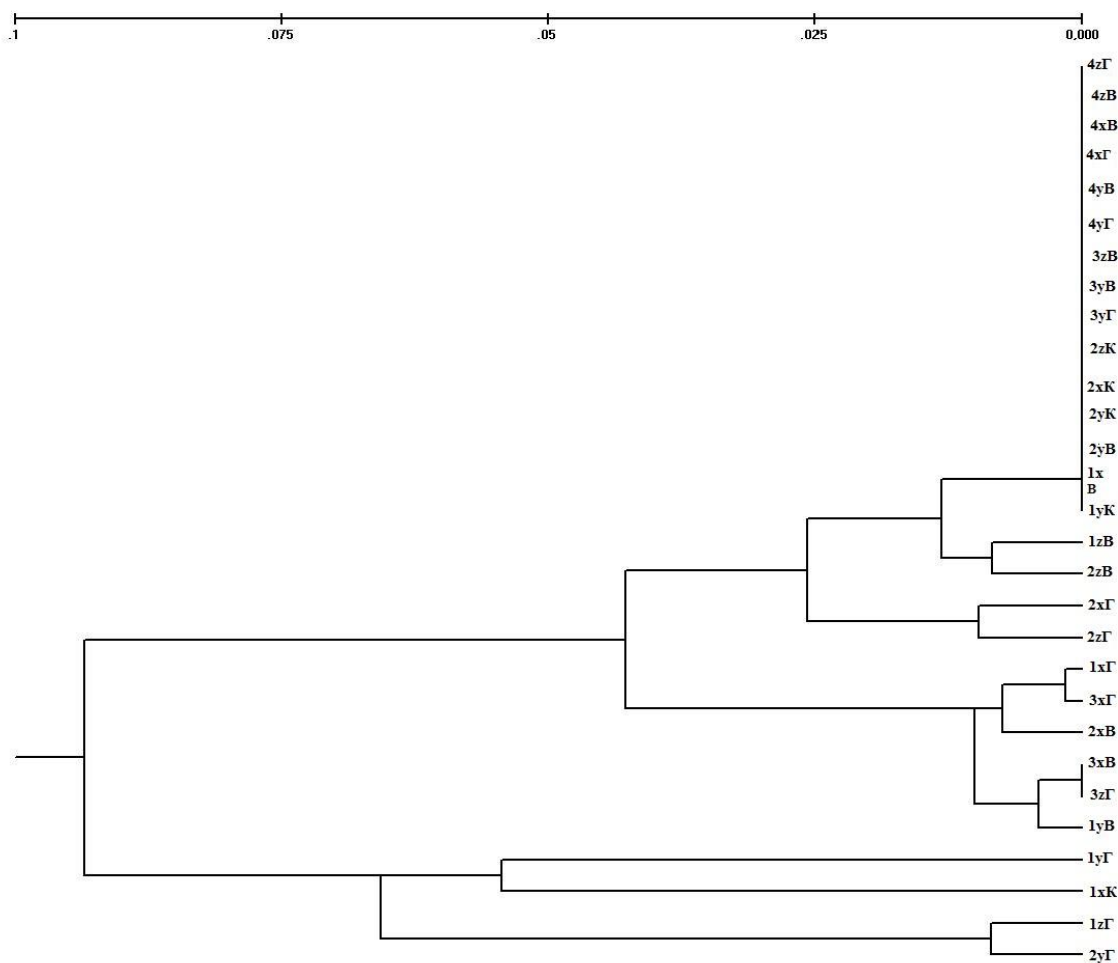
Праймер $(GAG)_6C$	«Икар»	«Ахтамас»	«Аргомак»	«Карплемхоз»
PIC	0,15	0,11	0,04	0,01
P, %	40	30	10	3

Таблица 6. Сравнительный анализ полиморфизма фрагментов ДНК по праймеру (GAG)₆C в хозяйствах «Икар», «Ахтамас», «Аргомак» и «Карплемхоз»

П.н.	«Икар»	«Ахтамас»	«Аргомак»	«Карплемхоз»
1380-1350	+	-	-	-
1180-1210	-	-	-	-
1120-1170	-	-	-	-
1060-1110	+	+	-	-
1000-1050	-	+	-	-
980-950	+	+	+	-
820-790	-	-	-	-
710-680	+	-	-	-
650-640	-	-	-	+
400-380	-	-	-	-

«+» – полиморфизм по данному фрагменту ДНК; «-» – консервативный участок ДНК по данному фрагменту

Для более наглядной оценки четырех хозяйств были построены четыре таблицы (Табл. 7, 8, 9, 10). Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что наиболее консолидированным является хозяйство «Карплемхоз», в котором среднее значение PIC = 0,03, а P = 7,6%.

**Рис. 3.** Дендрограмма генетических взаимоотношений, построенных на основании генетических дистанций у лошадей карачаевской породы лошадей в четырех различных хозяйствах по праймеру (GAG)₆C.

1 – «Икар», 2 – «Ахтамас», 3 – «Аргомак», 4 – «Карплемхоз»; у – жеребец, х – кобыла, z – кобылка; Г – гнедая масть, В – вороная масть, К – караковая масть

На основании полученных низких значений доли полиморфных локусов и индекса PIC можно утверждать, что исследованные лошади из ООО «Карплемхоз» обладают высокой степенью генетической консолидации, особенно для уровня локальной породы (Табл. 8). (Воронкова и др., 2011). Хозяйством с самым высоким уровнем полиморфизма является «Икар», среди лошадей которого среднее значение PIC = 0,24, а P = 59 % (Табл. 10). ООО «Ахтамас» и «Аргомак» занимают промежуточные места по этим показателям, в «Ахтамасе» среднее значение PIC = 0,11, а P = 32,3 %. Можно сделать вывод, что исследованные лошади из ООО «Плем-Репродуктор «Ахтамас»» и «Аргомак» также генетически исключительно высоко консолидированы, особенно для уровня локальной породы, но, тем не менее, сохраняют определённую степень генетического разнообразия, что особенно важно для успеха дальнейшей племенной работы и сохранения породы. В среднем индекс генетической идентичности в этих четырех хозяйствах равен 0,8105.

Таблица 7. Основные параметры спектров продуктов амплификации (ISSR-PCR маркеры), полученных на геномной ДНК карачаевских лошадей (100 голов) хозяйства «Ахтамас»

Праймер	(AG) ₉ C	(GA) ₉ C	(GAG) ₆ C	В сумме по трём праймерам
Количество локусов в спектре продуктов амплификации	14	15	10	39
Границы длин анализируемых локусов, п.о.	380-1750	380-1750	380-1380	380-1750
Полиморфное информационное содержание (PIC)	0,08	0,14	0,11	0,11
Доля полиморфных локусов (P, %)	21,0	46,0	30,0	32,3

Таблица 8. Основные параметры спектров продуктов амплификации (ISSR-PCR маркеры), полученных на геномной ДНК карачаевских лошадей (65 голов) хозяйства «Карплемхоз»

Праймер	(AG) ₉ C	(GA) ₉ C	(GAG) ₆ C	В сумме по трём праймерам
Количество локусов в спектре продуктов амплификации	14	15	10	39
Границы длин анализируемых локусов, п.о.	380-1750	380-1750	380-1380	380-1750
Полиморфное информационное содержание (PIC)	0,05	0,03	0,01	0,03
Доля полиморфных локусов (P, %)	14,0	6,0	3,0	7,6

Таблица 9. Основные параметры спектров продуктов амплификации (ISSR-PCR маркеры), полученных на геномной ДНК карачаевских лошадей (32 голов) хозяйства «Аргомак».

Праймер	(AG) ₉ C	(GA) ₉ C	(GAG) ₆ C	В сумме по трём праймерам
Количество локусов в спектре продуктов амплификации	14	15	10	39
Границы длин анализируемых локусов, п.о.	380-1750	380-1750	380-1380	380-1750
Полиморфное информационное содержание (PIC)	0,12	0,23	0,04	0,13
Доля полиморфных локусов (P, %)	35,0	73,0	10,0	39,3

Таблица 10. Основные параметры спектров продуктов амплификации (ISSR-PCR маркеры), полученных на геномной ДНК карачаевских лошадей (38-40 голов) хозяйства «Икар»

Праймаер	(AG) ₉ C	(GA) ₉ C	(GAG) ₆ C	В сумме по трём праймаерам
Количество локусов в спектре продуктов амплификации	14	15	10	39
Границы длин анализируемых локусов, п.о.	380-1750	380-1750	380-1380	380-1750
Полиморфное информационное содержание (PIC)	0,26	0,31	0,15	0,24
Доля полиморфных локусов (P, %)	64,0	73,0	40,0	59,0

Полиморфизм спектров ISSR-PCR маркеров значительно отличается в зависимости от использованных в качестве праймаера м/с. Так, наименьший полиморфизм спектров выявлен у праймаера (GAG)₆C: «Карплемхоз» – 0,01; «Ахтамас» – 0,11; «Аргомак» – 0,04; «Икар» – 0,15.

По всем четырем хозяйствам с использованием трех праймаеров (39 локусов) была построена дендрограмма (Рис. 4). На ней также видно два больших кластера, которые делятся на 2 подкластера. Первый из них включает в себя группы животных из хозяйства «Икар», а второй – группы животных из трех остальных хозяйств. Следует отметить, что во втором подкластере, который в свою очередь подразделился на более мелкие подкластеры, животные группируются сверху вниз по принадлежности к хозяйству.

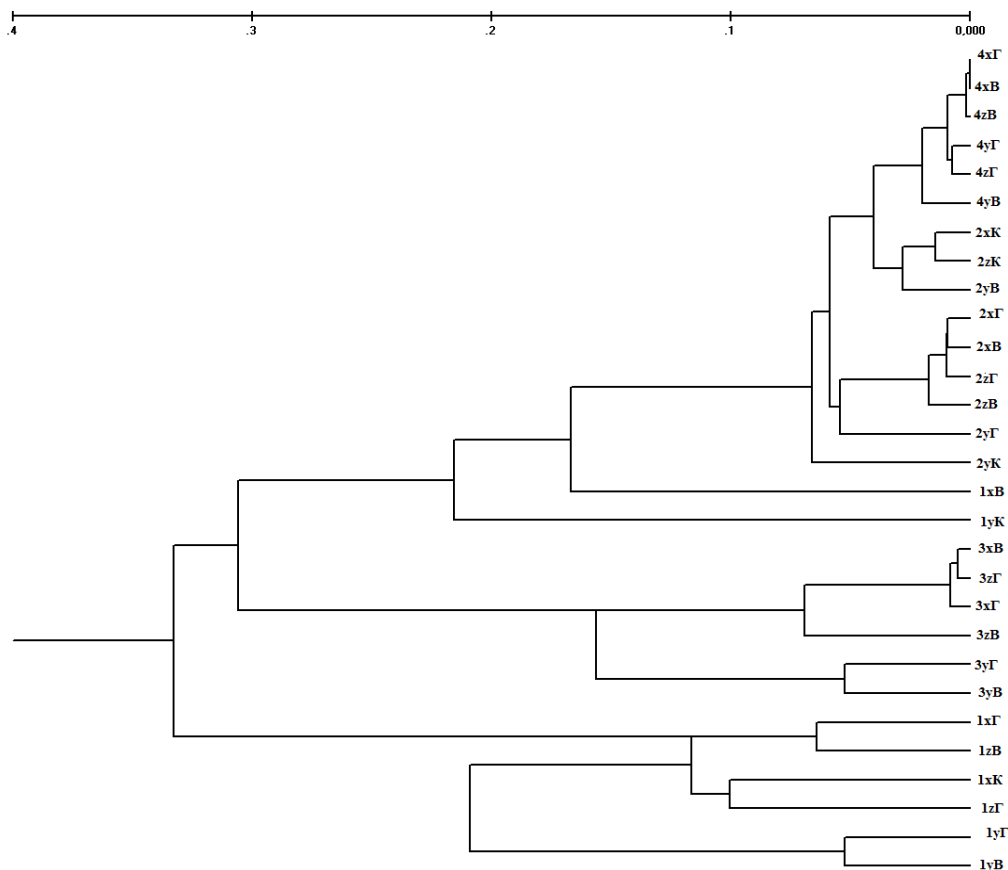


Рис. 4. Дендрограмма генетических взаимоотношений, построенных на основании генетических дистанций у лошадей карачаевской породы лошадей в четырех различных хозяйствах по праймаерам (AG)₉C, (GA)₉C и (GAG)₆C

1 – «Икар», 2 – «Ахтамас», 3 – «Аргомак», 4 – «Карплемхоз»; у – жеребец, х – кобыла, z – кобылка; Г – гнедая масть, В – вороная масть, К – караковая масть

В хозяйствах «Икар» и «Ахтамас», помимо гнедых и вороных, присутствовали животные с караковой мастью. Это объясняется тем, что лошади карачаевской породы характеризуются преимущественно гнедой, вороной и караковой мастью, а их помеси отличаются большим разнообразием окраски (Захаров, 2012). На основании распределения данных мастей была построена общая дендрограмма по трем праймерам (Рис. 5). На ней видно, что и в хозяйстве «Икар» и в Племярепродукторе «Ахтамас» животные с караковой мастью образуют отдельные подкластеры. Исходя из полученных результатов, можно ожидать, что животные с караковой мастью имеют более уникальную генетическую структуру по сравнению с лошадьми гнедой и вороной мастей и имеют свои особенности по происхождению, отличающие их от других лошадей карачаевской породы.

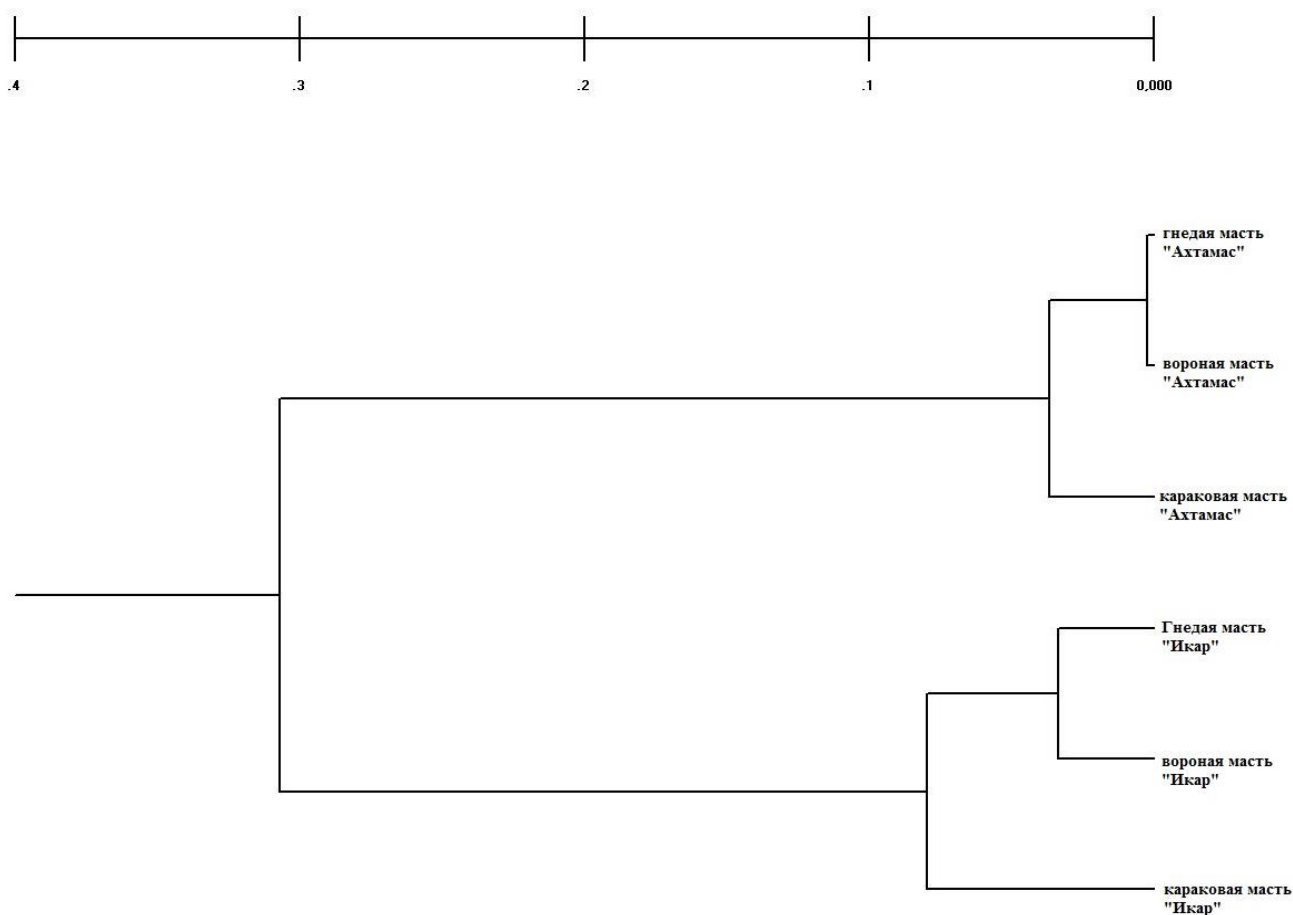


Рис. 5. Дендрограмма генетических взаимоотношений, построенных на основании генетических дистанций у лошадей карачаевской породы лошадей в четырех различных хозяйствах по праймерам (AG)9C, (GA)9C и (GAG)6C в зависимости от масти

Для наиболее точной оценки данных хозяйств, было учтено их географическое положение (Рис. 6). На данной карте видно, что все хозяйства равноудалены друг от друга, при этом ООО «Икар» и ООО «Аргомак» находятся в более гористой местности, у подножия хребта, объединения «Ахтамас» и «Каплемхоз» расположены в более равнинной местности.

Согласно проведенным исследованиям, при использовании ISSR-PCR метода отмечается дифференциация между четырьмя хозяйствами, занимающимися разведением карачаевской породы лошадей, по трем праймерам. Из полученных данных можно сделать вывод, что более консервативными по спектрам ампликонов при использовании праймеров (GA)9C, (AG)9C и (GAG)6C является группа животных из хозяйства «Карпемхоз». Животные из ООО Племярепродуктор «Икар» обладают самым высоким полиморфизмом по всем трем праймерам. Это позволяет предположить, что идет разный вклад в воспроизводство животных производителей, отличающихся по уровню полиморфизма, в зависимости от хозяйства использования производителей.

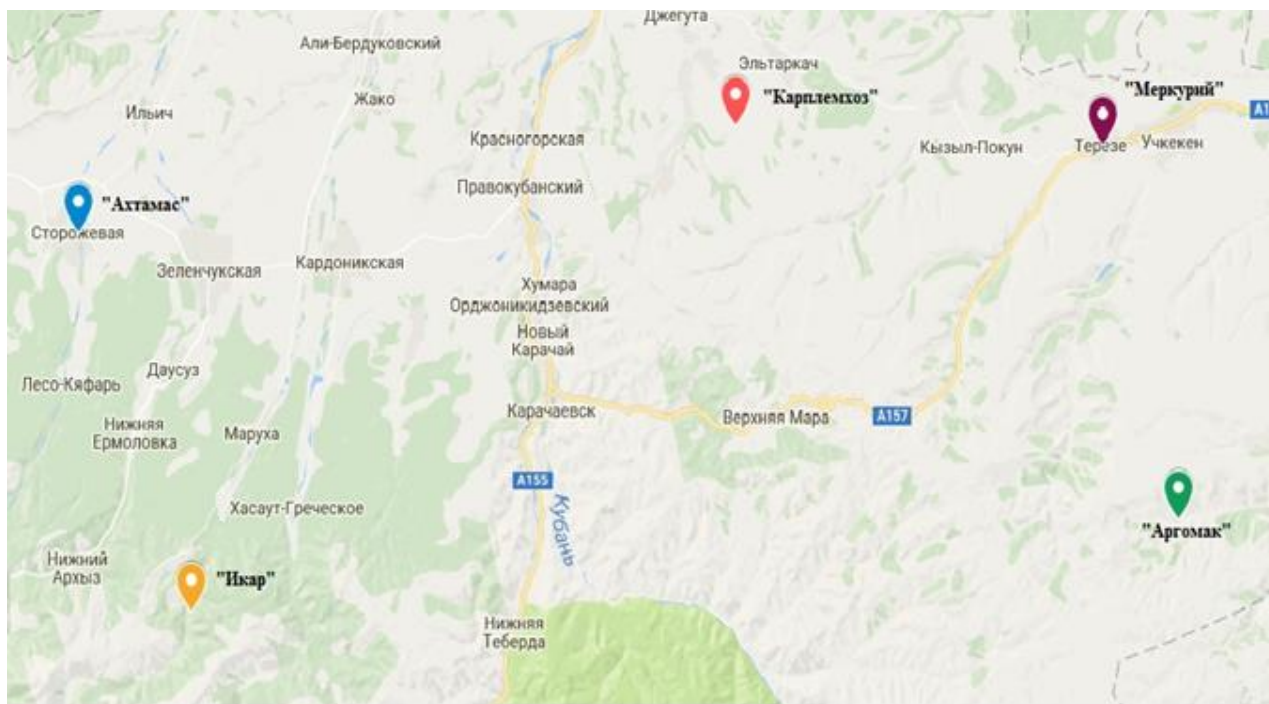


Рис. 6. Географическое положение хозяйств «Ахтамас», «Аргомак», «Икар» и «Карплемхоз»

4. Заключение

На основании генотипирования 39 локусов можно сделать заключение о существенной генетической дифференциации лошадей, воспроизводившихся в разных хозяйствах. Можно ожидать, что относительно повышенный полиморфизм в хозяйствах «Икар» и «Аргомак» обусловлен условиями их разведения в более гористой местности по сравнению с другими хозяйствами. Обращает на себя внимание популяционно-генетические отличия в двух хозяйствах лошадей караковой масти от лошадей гнедой и вороной мастей. По-видимому, носители караковой масти имеют особое происхождение по сравнению с носителями двух других мастей.

Литература

[Бардуков и др., 2014](#) – Бардуков Н.В., А.В. Феофилов, Т.Т. Глазко, В.И. Глазко (2014). ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геноме домашней лошади *Equus caballus* // *Сельскохозяйственная биология*, № 4, с. 42-57.

[Воронкова и др., 2011](#) – Воронкова В.Н., Цэндсүрэн Цэдэв, Сулимова Г.Е. (2011). Сравнительный анализ информативности ISSR-маркеров для оценки генетического разнообразия пород лошадей // *Генетика*, Т. 47. № 8. С. 1131-1134.

[Глазко и др., 2013](#) – Глазко В.И., Гладырь Е.А., Феофилов А.В., Бардуков Н.В., Глазко Т.Т. (2013). ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геномах сельскохозяйственных видов млекопитающих // *Сельскохозяйственная биология*, том 2, С. 71-76.

[Захаров, 2012](#) – Захаров В.А. (2012). Использование лошадей кабардинской и карачаевской пород в досуговом коневодстве // *Достижения науки и техники АПК*, № 4.

[Калашников и др., 2011](#) – Калашников В.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М. и др. (2011). Полиморфизм микросателлитной ДНК у лошадей заводских и локальных пород // *Сельскохозяйственная биология*, №2, с. 41-45.

[Литвинова, 2011](#) – Литвинова Н.Ю. (2011). Использование кластерного анализа при изучении генетической структуры популяции крупного рогатого скота // *Молочнохозяйственный вестник*, №3, 3 кв.

Ольховская и др., 2011 – Ольховская Л.В., С.В. Криворучко, М.И. Целовальникова (2011). Выявление степени генетического родства карачаевской, тувинской и арабской пород лошадей // *РВЖ СХЖ*, № 1, с. 19.

Парфенов, Политова, 2005 – Парфенов В., Политова М. (2005). Легенда Карачая // *Конный мир*. № 1.

Парфенов, Хотов, 2010 – Парфенов В.А., Хотов В.Х. (2010). Государственная племенная книга лошадей карачайской породы. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, Москва, Российский Государственный Аграрный Университет – МГАУ, V.6

Храброва, Блохина, 2012 – Храброва Л.А., Блохина Н.В. (2012). Руководство по использованию микросателлитов ДНК при генотипической оценке лошадей. Дивово, 20 с.

Храброва и др., 2016 – Храброва Л.А., Зайцев А.М., Белоусова Н.Ф., Юрьева И.Б., Басс С.П. (2016). Аборигенные породы лошадей: сохранение и использование генофонда // *Научно практический журнал Farm Animals*, № 3-4, с. 70.

Эркенов, 2015 – Эркенов Т.А. (2015). Генетическая структура и внутривидовая дифференциация карачаевской лошади // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук / Москва, 2015.

Эркенов и др., 2015 – Эркенов Т.А., М.А. Елькина, Ю.А. Юлдашбаев, В.И. Глазко (2015). Полиморфизм мобильных генетических элементов в геномах домашней лошади // *Известия ТСХА*, вып. 3.

Botstein et al., 1980 – Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 32, No 3, pp. 314–331.

FAO, 2015 – The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture Organization of the United Nations / Rome, 2015.

Hendrickson, 2013 – Hendrickson S.L. (2013). A genome wide study of genetic adaptation to high altitude in feral Andean horses of the paramo // *BMC Evol Biol.*, Vol.13, 273. doi: 10.1186/1471-2148-13-273

Ludwig et al., 2009 – Ludwig Arne, Melanie Pruvost, Monika Reissmann, Norbert Benecke, Gudrun A. Brockmann, Pedro Castaños, Michael Cieslak, Sebastian Lippold, Laura Llorente, Anna-Sapfo Malaspinas, Montgomery Slatkin, Michael Hofreiter (2009). Coat Color Variation at the Beginning of Horse Domestication // *Science*, Vol. 324.

Nei, 1972 – Nei M. (1972). Genetic distance between populations, *Amer. Naturalist*, Vol. 106, No. 949, pp. 283–2927.

Pruvost et al., 2011 – Pruvost M., Bellone R., Benecke N., Sandoval-Castellanos E., Cieslak M., Kuznetsova T., Morales-Muniz A., O'Connor T., Reissmann M., Hofreiter M., Ludwig A. (2011). Genotypes of predomestic horses match phenotypes painted in Paleolithic works of cave art // *PNAS*, Vol. 108, No. 46. pp. 18626–18630, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1108982108.

Simonson et al., 2010 – Tatum S. Simonson, Yingzhong Yang, Chad D. Huff, Haixia Yun, Ga Qin, David J. Witherspoon, Zhenzhong Bai, Felipe R. Lorenzo, Jinchuan Xing, Lynn B. Jorde, Josef T. Prchal, RiLi Ge (2010). Genetic Evidence for High-Altitude Adaptation in Tibet, *Science* 329, 72.

Stormont, 1951 – Stormont C. (1951). An example of a recessive blood group in sheep // *Genetics*, Vol. 36, pp. 577–578.

Stormont, 1958 – Stormont C. (1958). On the applications of blood Groups in Animal Breeding // *International Congress of Genetics*, Vol. 1, pp. 20–27.

Stormont, 1967 – Stormont C. (1967). Contribution of Blood typing to dairy science progress // *J. Dairy Sci*, Vol. 50, p. 253.

Stormont, Morris, 1992 – Stormont C., Morris B.G. (1992). New antibodies in beson blood typing: 23ed Conf. Jnt. Sos. Anim. Genet. Interlaken, 3-7 Aud., 1992 // *Anim. Genet*, 23, No. 1 Suppl, p. 12.

Zietkiewicz et al., 1994 – Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*, V. 20, pp. 176–183.

References

- [Bardukov et al., 2014](#) – Bardukov N.V., A.V. Feofilov, T.T. Glazko, V.I. Glazko (2014). ISSR-PCR markers and mobile genetic elements in the genome of a domestic horse *Equus caballus*, *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*, No. 4, p. 42-57.
- [Voronkova et al., 2011](#) – Voronkova V.N., Tsendursen Tsedev, Sulimova G.E. (2011). Comparative analysis of the informative value of ISSR markers for assessing the genetic diversity of breeds of horses, *Genetika*, T. 47, No. 8, pp. 1131-1134.
- [Glazko et al., 2013](#) – Glazko VI, Gladyr EA, Feofilov AV, Bardukov NV, Glazko TT (2013). ISSR-PCR markers and mobile genetic elements in genomes of agricultural mammal species, *Agricultural Biology*, Vol. 2, pp. 71-76.
- [Zakharov, 2012](#) – Zakharov V.A. (2012). Use of horses of Kabardian and Karachai breeds in leisure horse breeding, *Achievements of science and technology of agroindustrial complex*, № 4.
- [Kalashnikov et al., 2011](#) – Kalashnikov V.V., Khrabrova L.A., Zaitsev A.M. et al. (2011). Polymorphism of microsatellite DNA in horses of stud and local breeds, *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*, No. 2, pp. 41-45.
- [Litvinova, 2011](#) – Litvinova N.Yu. (2011). Use of cluster analysis in the study of the genetic structure of the cattle population, *Molochnoiyskoy vestnik*, No. 3, 3 kv.
- [Olkhovskaya et al., 2011](#) – Olkhovskaya L.V., S.V. Krivoruchko, M.I. Tselovalnikova (2011). Identification of the degree of genetic kinship of Karachay, Tuvan and Arabian breeds of horses, *RVZhSHZH*, No. 1, p. 19.
- [Parfenov, Politova, 2005](#) – Parfenov V., Politova M. (2005). Legend of Karachay, *Equestrian world*. № 1.
- [Parphenov, Khotov, 2010](#) – Parphenov V.A., Khotov V.H. (2010). State Studbook horses of Karachai breed. Ministry of Agriculture of Russian Federation, Moscow, Russian State Agrarian University – MTA, Vol. 6.
- [Khrabrova, Blokhina, 2012](#) – Khrabrova L.A., Blokhina N.V. (2012). Manual on the use of DNA microsatellites in the genotypic assessment of horses. Divovo, p. 20.
- [Khrabrova et al., 2016](#) – Khrabrova LA, A.M. Zaitsev, N.F. Belousova, I.B. Yuryeva, S.P. Bass (2016). Aboriginal breeds of horses: preservation and use of the gene pool, *Scientific practical journal Farm Animals*. № 3-4, p. 70
- [Erkenov, 2015](#) – Erkenov T.A. (2015). Genetic structure and in-breed differentiation of the Karachai horse. The dissertation author's abstract on competition of a scientific degree of the candidate of agricultural sciences. Moscow.
- [Erkenov et al., 2015](#) – T.A. Erkenov, M.A. Yel'kina, Yu.A. Yuldashbaev, V.I. Glazko (2015). Polymorphism of mobile genetic elements in the genomes of a domestic horse, *Izvestiya TSKhA*, Vol. 3.
- [Botstein et al., 1980](#) – Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 32, No 3, pp. 314-331.
- [FAO, 2015](#) – The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Recourses for Food and Agriculture Organization of the United Nations / Rome, 2015.
- [Hendrickson, 2013](#) – Hendrickson S.L. (2013). A genome wide study of genetic adaptation to high altitude in feral Andean horses of the paramo, *BMC Evol Biol.*, Vol.13, 273. doi: 10.1186/1471-2148-13-273
- [Ludwig et al., 2009](#) – Ludwig Arne, Melanie Pruvost, Monika Reissmann, Norbert Benecke, Gudrun A. Brockmann, Pedro Castaños, Michael Cieslak, Sebastian Lippold, Laura Llorente, Anna-Sapfo Malaspinas, Montgomery Slatkin, Michael Hofreiter (2009). Coat Color Variation at the Beginning of Horse Domestication, *Science*, Vol. 324.
- [Nei, 1972](#) – Nei M. (1972) Genetic distance between populations, *Amer. Naturalist*, Vol. 106, No. 949, pp. 283-2927.
- [Pruvost et al., 2011](#) – Pruvost M., Bellone R., Benecke N., Sandoval-Castellanos E., Cieslak M., Kuznetsova T., Morales-Muniz A., O'Connor T., Reissmann M., Hofreiter M., Ludwig A. (2011). Genotypes of predomestic horses match phenotypes painted in Paleolithic works of cave art. *PNAS*, Vol. 108, No. 46. pp. 18626-18630, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1108982108.
- [Simonson et al., 2010](#) – Tatum S. Simonson, Yingzhong Yang, Chad D. Huff, Haixia Yun, Ga Qin, David J. Witherspoon, Zhenzhong Bai, Felipe R. Lorenzo, Jinchuan Xing, Lynn B. Jorde,

Josef T. Prchal, RiLi Ge (2010). Genetic Evidence for High-Altitude Adaptation in Tibet, *Science* 329, 72.

Stormont, 1951 – Stormont C. (1951). An example of a recessive blood group in sheep, *Genetics*, Vol. 36, pp. 577–578.

Stormont, 1958 – Stormont C. (1958). On the applications of blood Groups in Animal Breeding, *International Congress of Genetics*, Vol. 1, pp. 20–27.

Stormont, 1967 – Stormont C. (1967). Contribution of Blood typing to dairy science progress, *J. Dairy Sei*, Vol. 50, p. 253.

Stormont, Morris, 1992 – Stormont C., Morris B.G. (1992). New antibodies in beson blood tuping: 23ed Conf. Jnt. Sos. Anim. Genet. Interlaken, 3-7 Aud., 1992, *Anim. Genet*, 23, No. 1 Suppl, p. 12.

Zietkiewicz et al., 1994 – Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics*, V. 20, pp. 176–183.

УДК 539.1.047:575.224

Спектры ISSR-PCR маркеров в оценках внутривидовой генетической дифференциации карачаевской лошади

Татьяна Владимировна Голик ^a, Ирина Игоревна Гапонова ^a, Евгения Александровна Князева ^a, Тимур Алипович Эркенов ^a, Татьяна Теодоровна Глазко ^{a, b, *}

^a РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, Российская Федерация

^b Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий, Российская Федерация

Аннотация. Генофонд местных отечественных пород непрерывно сокращается, а, следовательно, происходит уменьшение биоразнообразия животных, обладающих высоким адаптивным потенциалом. Данная проблема требует развития методов, которые способны выявить уникальные особенности таких аборигенных животных и сохранить генетические ресурсы сельскохозяйственных видов млекопитающих. В данной работе выполнен анализ генотипов лошадей карачаевской породы из четырех различных хозяйств («Ахтамас», «Аргомак», «Икар», «Карплемхоз») по 39 локусам с применением методов генотипирования продуктов амплификации фрагментов геномной ДНК лошадей, фланкированных инвертированными повторами участков микросателлитных локусов (AG)₉C, (GA)₉C и (GAG)₆C с использованием полимеразной цепной реакции (Inter-Simple Sequence Repeats – ISSR-PCR маркеры). Был произведен анализ генотипов лошадей разных мастей, полученные результаты показывают, что животные с караковой мастью имеют более уникальную генетическую структуру по сравнению с лошадьми гнедой и вороной мастей и имеют свои особенности по происхождению, отличающие их от других лошадей карачаевской породы. Получены данные, свидетельствующие о достаточно высокой степени консолидированности исследованной группы животных, обнаружено, что в среднем индекс генетической идентичности между животными равен 0,8105. Относительно повышенным полиморфизмом отличались спектры продуктов амплификации у лошадей из ООО Плем-Репродуктора «Икар», а наибольшей консолидированностью обладали животные из хозяйства «Карплемхоз».

Ключевые слова: карачаевская порода лошадей, спектры продуктов амплификации, генетическая дифференциация, ISSR-PCR маркеры, консолидированность.

* Корреспондирующий автор

Адреса электронной почты: tglazko@rambler.ru (Т.Т. Глазко)