

ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ РІЗНИХ ISSR-МАРКЕРІВ ПРИ ДОСЛІДЖЕННІ КОНЕЙ

Н. Б. МОХНАЧОВА, Л. Ф. СТАРОДУБ, М. Л. ДОБРЯНСЬКА

Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (Чубинське, Україна)

<https://orcid.org/0000-0001-5982-6542> – Н. Б. Мохначова

<https://orcid.org/0000-0002-9565-807X> – Л. Ф. Стародуб

*<https://orcid.org/0000-0001-9216-0527> – М. Л. Добрянська
nm82@i.ua*

В статті представлено результати проведення молекулярно-генетичних досліджень здійснених на зразках біологічного матеріалу від давніх коней (ДНК виділено з викопних решток плейстоценового коня і тарпана) та трьох аборигенних порід сучасних коней (коник польський, гуцульська порода, арабська порода). Дослідження проводились в лабораторії генетики ІРГТ ім. М.В.Зубця НААН. Для вивчення поліморфізму ДНК коней за ISSR-маркерами, використали вісім праймерів що вважаються найбільш інформативними (AG)₈CA, (AG)₉C, (GA)₆CC, (GA)₉C, (AG)₈CG, (GAG)₆C, (ACC)₆G, (CTC)₆C. Дана робота була здійснена для порівняння ефективності використання кожного із маркерів та подальшого вибору оптимального їх поєднання при дослідженні поліморфізму генетичної структури коней. В результаті роботи нами виявлено, що найбільш ефективним для виявлення поліморфізму за індексом PIC у коней було використання в якості праймерів послідовностей (AG)₈CA, (AG)₉C, та (ACC)₆G. Для отримання найбільшого спектру фрагментів ампліфікації у коней за методикою ISSR-PCR самим ефективним було використання послідовності (GA)₆CC та (GAG)₆C.

Ключові слова: ДНК, ISSR-маркери, ПЛР, генетична структура, коні

THE EFFECTIVENESS OF THE USE OF VARIOUS ISSR-MARKERS IN THE STUDY OF HORSES

N. B. Mokhnachova, L. F. Starodub, M. L. Dobryanska

Institute of Animal Breeding and Genetic nd. a. M.V.Zubets of NAAS (Chubynske, Ukraine)

The article presents the results of molecular genetic studies performed on samples of biological material from ancient horses (DNA isolated from fossils of Pleistocene horse and tarpan) and three aboriginal breeds of modern horses (Polish horse, Hutsul breed, Arabian breed) using eight ISSR-markers. The research was conducted in the laboratory of genetics Institute of Animal Breeding and Genetic nd. a. M.V.Zubets of NAAS. To study the DNA polymorphism of horses on ISSR markers, we used eight primers that are considered the most informative (AG)₈CA, (AG)₉C, (GA)₆CC, (GA)₉C, (AG)₈CG, (GAG)₆C, (ACC)₆G, (CTC)₆C. This study was carried out to compare the effectiveness of each of the markers and then select the optimal combination in the study of polymorphism of the genetic structure of horses. As a result, we found that the most effective for the detection of polymorphism in the RIS index in horses was the use of primers sequences (AG) 8CA, (AG) 9C, and (ACC) 6G. To obtain the largest range of amplification fragments in horses by ISSR-PCR, the most effective was the use of the sequence (GA) 6CC and (GAG) 6C

Keywords: DNA, ISSR, PCR-markers, genetic structure, horses

Вступ. Молекулярні маркери займають визначне місце в сучасних генетичних дослідженнях і в селекції. На сьогоднішній день розроблено та широко використовуються різні

типи маркерів та методик визначення генетичного поліморфізму [1, 2] ДНК та оцінки генетичної структури популяцій різних біологічних об'єктів в тому числі сільськогосподарських. Ці методи швидко вдосконалювалися з кінця 1980-х років, після відкриття методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Кожен з цих методів має свої переваги та недоліки.

З 1994 року став доступний новий метод молекулярних маркерів, названий Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). ISSR – це різновид RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) методу, при якому застосовують для ПЛР одиничний короткий праймер. Використовуючи ISSR-маркери проводять ампліфікацію за допомогою ПЛР у присутності одного праймера, комплементарного мікросателітній послідовності, тобто генотипування проводиться набором локусів анонімних фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими мікросателітними повторами. Цей метод є менш складним і дозволяє отримати профілі ДНК окремих геномів на основі фрагментів ДНК (анонімної ДНК) різної довжини.

Полілокусні спектри отримані ISSR-PCR мають породоспецифічні та видоспецифічні особливості. Виявлена видоспецифічність цих маркерів може бути наслідком рекомбінації між різними мобільними генетичними елементами, яка виникає на різних етапах розходження генфондів від предкових видів [3]. Тому цей підхід може бути використаний в якості корисного інструменту для моніторингу генетичного різноманіття різних популяцій (або порід) тварин [4, 5].

Україна здавна була місцем розвинутого конярства. Проте дослідження коней на молекулярно-генетичному рівні в нашій країні почалося лише в середині 90-х років. За цей час визначено, що мікросателіти займають 2% геному домашнього коня і з використанням ISSR-PCR маркерів можна отримати полілокусні спектри фрагментів ДНК, поліморфізм яких достатньо надійно відрізняє одну породу коней від іншої [6, 7]. Українські породи коней на молекулярно-генетичному рівні практично не досліджені. Тому **метою** наших досліджень було оцінити ефективність використання різних ISSR-маркерів при дослідженні генетичної структури сучасних та давніх коней.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводились в лабораторії генетики ІРГТ ім. М.В.Зубця НААН на таких зразках:

1. Викопні кістки коней плейстоценового періоду (близько 10 тис. р. до нашої ери). Одна кістка знайдена в с. Буки Житомирської обл. в кар'єрі. Розкопки здійснені у 1960 р., кістка п'ястку (os. tarsi central). Інша кістка знайдена в Новгороді-Сіверському Чернігівської обл. в кар'єрі. Розкопки проводилися П. І. Борисковським в 1935 р.

2. Зуб дикого коня тарпана (4,5 тис. р. до н. е.) знайдений в с. Скибниця Тростянецького району Вінницької області. Розкопки проведені у 1959 році В. М. Даниленком. Для дослідження палеонтологічний матеріал був наданий Київським національним науково-природничим музеєм НАН України, відділом палеонтології.

3. Венозна кров від 50 коней: арабської породи (Ягільницький кінний завод), коник польський (Яворівський національний природний парк), гуцульської породи (ТзОВ «Край неба» Івано-Франківська область, Національний природний парк «Гуцульщина»).

Геномну ДНК виділяли за допомогою комплекту реактивів «ДНК-сорб Б» (АмпліСенс, РФ). Із викопних решток коней ДНК виділяли оптимізованим методом із використанням протеїнази K та дитіотреїтолу [8].

Концентрацію отриманої ДНК в отриманому препараті визначали в агарозному гелі шляхом порівняння яскравості полос фрагментів, які аналізуються і стандартного препарату ДНК (фрагменти фага λ).

Для вивчення поліморфізму ДНК коней за ISSR-маркерами, проводили оптимізацію температурних режимів проведення ПЛР за восьми праймерами, що вважаються найбільш інформативними [9] (табл. 1).

Суміш для проведення ПЛР у своєму складі містила: 1 мкл буфера для Tag-полімерази, 1 мкл суміші трифосфатів («Амплісенс», РФ), 0,8 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази («Fermentas», Литва), вода для ПЛР 3 мкл. Геномна ДНК додавалась у кількості

4 мкл. Загальний об'єм ДНК-суміші становив 10 мкл. Ампліфікацію проводили на програмованому чотирьох канальному термоциклі «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). Програма ампліфікації включала первинну денатурацію (95°C, 2 хв.); 30 циклів денатурації (95°C, 30 с), гібридизація праймерів (54–64°C, 30 с) та елонгація (72°C, 1 хв.), фінішна елонгація (72°C, 5 хв.).

1. Послідовності праймерів, які використовувалися у дослідженні

№ п/п	Послідовність праймера	Мотив	Температура випалу
1	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	(GA) ₉ C	57°C
2	5'-ACCACCACCACCACCG-3'	(ACC) ₆ G	64°C
3	5'-GAGGAGGAGGAGGAGGC-3'	(GAG) ₆ C	64°C
4	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	(AG) ₉ C	57°C
5	5'-AGAGAGAGAGAGAGCG-3'	(AG) ₈ CG	56°C
6	5'-GAGAGAGAGAGACC-3'	(GA) ₆ CC	54°C
7	5'-CTCCTCCTCCTCCTCC-3'	(CTC) ₆ C	64°C
8	5'-AGAGAGAGAGAGAGCA-3'	(AG) ₈ CA	54°C

Продукти полімеразної ланцюгової реакції розділяли у 2% агарозному гелі в 1 × TBE-буфері при напрузі 90 В (тривалість фореузу 2 год.). Візуалізацію проводили на транслюмінаторі в УФ-світлі при довжині хвилі 380 нм. Розміри отриманих продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркеру молекулярних мас ThermoScientific™ GeneRuler 1 kbPlusDNALadder, ready-to-use-75-20000 bp.

Для розрахунку індексу поліморфного інформаційного змісту (PIC-polymorphic information content) використовували PIC калькулятор [10].

Результати досліджень.

Метод ISSR-аналізу вперше був застосований у відділі генетики і біотехнології ІРГТ ім. М.В.Зубця НААН для вивчення генетичної структури давніх коней (ДНК виділено з викопних решток) та аборигенних порід коней з України. Проведено аналіз ефективності використання восьми різних ISSR-маркерів для оцінки генетичної різноманітності дикого коня тарпана, коня плейстоценового періоду, коника польського, коней гуцульської породи та арабської породи (рис. 1). Дослідження генетичного поліморфізму коней проводились з використанням послідовності праймерів із динуклеотидних ((GA)₉C, (AG)₉C, (AG)₈CG, (GA)₆CC, (AG)₈CA) та тринуклеотидних ((ACC)₆G, (GAG)₆C, (CTC)₆C) повторів. Для точнішої оцінки довжин виявлених фрагментів ампліфікації була використана універсальна шкала, де застосована градація фрагментів ДНК за молекулярними масами. В залежності від зони («важкі», «середні» і «легкі» фрагменти) використовувався певний крок від 10 до 200 п. н. Внаслідок було виділено 38 зон з фіксованим інтервалом, які дозволяють досить точно визначати молекулярну масу для продуктів ампліфікації різної довжини і стандартизувати результати дослідження [11].

При дослідженні отриманих спектрів продуктів ампліфікації нами виявлено, що найбільшу кількість локусів було отримано в результаті використання в якості праймерів послідовностей (GA)₆CC та (GAG)₆C – 9 і 8 локусів (табл. 2). В той же час найбільш поліморфними за показником PIC виявились праймери (AG)₈CA – 0,27, (AG)₉C – 0,21 та (ACC)₆G – 0,21. Слід відзначити, що при використанні праймеру (GA)₆CC у дослідженні генетичного поліморфізму коней було отримано значний спектр продуктів ампліфікації -9 локусів, при цьому показник поліморфності був на рівні 0,16, що дозволяє достатньо ефективно використовувати його для дослідження. Використання послідовності (AG)₈CG характеризувалось найменшим індексом PIC і становило 0,02.

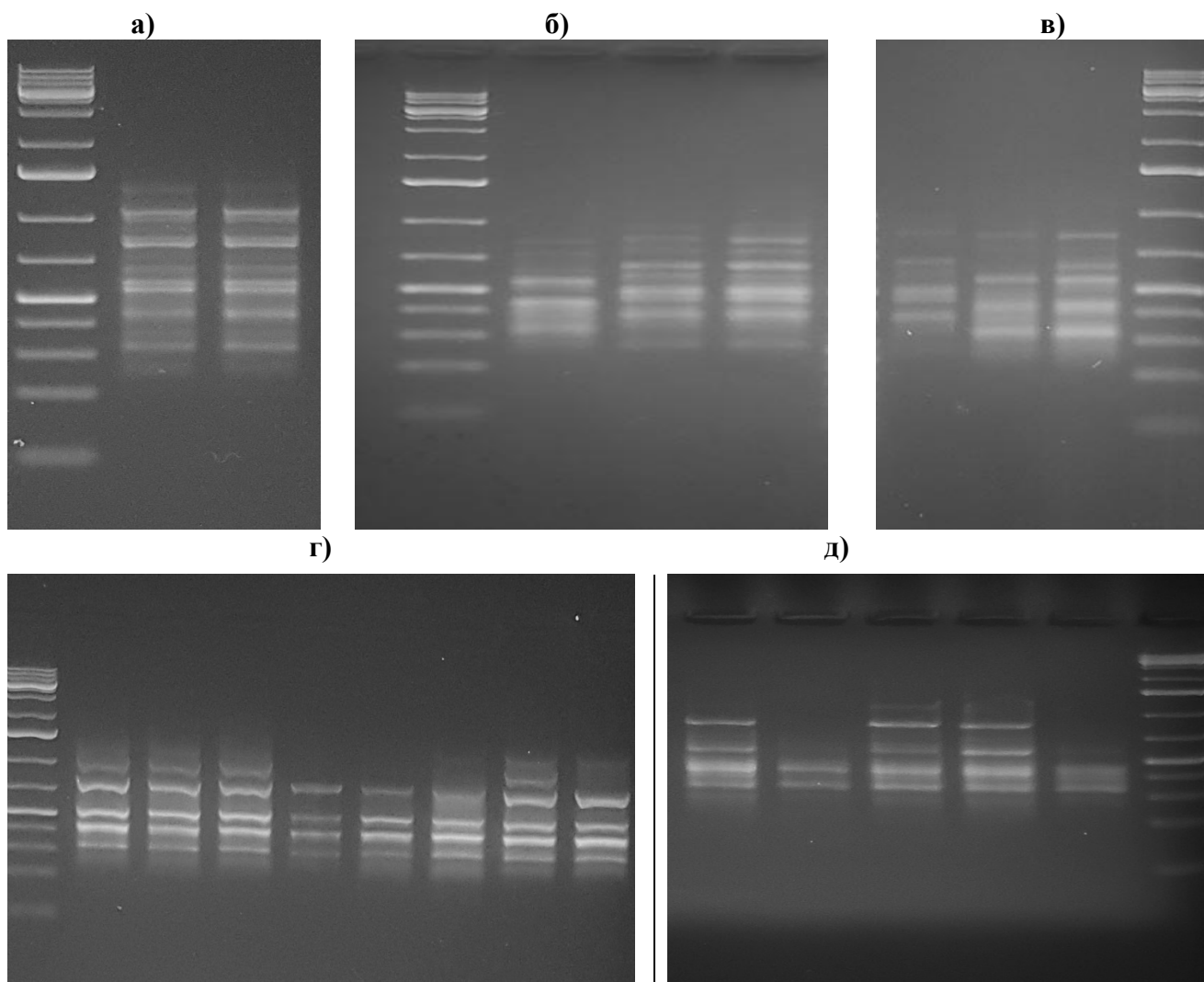


Рис. 1. Електрофореграми продуктів ампліфікації отриманих за використанням ISSR-маркерів коней: а) – арабської породи, б) – тарпана, в) – плейстоценового коня, г) – коник польський, д) – гуцзунської породи.

2. Інформативність ISSR-маркерів на основі ди- та тринуклеотидних мікросателітів

№ п/п	ISSR-маркери	Середня кількість локусів	PIC
Динуклеотидні мікросателіти			
1	(GA) ₉ C-ISSR	6	0,13
2	(AG) ₉ C-ISSR	6	0,21
3	(AG) ₈ CG-ISSR	7	0,02
4	(GA) ₆ CC-ISSR	9	0,16
5	(AG) ₈ CA -ISSR	7	0,27
Тринуклеотидні мікросателіти			
6	(ACC) ₆ G-ISSR	6	0,21
7	(GAG) ₆ C-ISSR	8	0,15
8	(CTC) ₆ C -ISSR	6	0,1

Примітка: PIC – індекс поліморфності

Висновок. Таким чином, в результаті проведеного дослідження нами виявлено, що найбільш ефективним для виявлення поліморфізму за індексом PIC у коней було використання в якості праймерів послідовностей (AG)₈CA, (AG)₉C та (ACC)₆G. Для отримання найбільшого

спектру ампліфікованих фрагментів у коней за методикою ISSR-PCR слід використовувати послідовності (GA)₆CC та (GAG)₆C.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Shubitowski D. M., Venta P. J., Douglass C. L., Zhou R. X., Ewart S. L. Polymorphism identification within 50 equine gene-specific sequence tagged sites. *Anim. Genet.* 2001. Vol. 32 (2). P. 78–88. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2001.00738.x

2. Caetano-Anolles G., Gresshoff P. M. Generation of sequence signatures from DNA amplification fingerprints with mini-hairpin and microsatellite primers. *Biotechniques.* 1996. Vol. 20 (6). P. 1044–1048.

3. Бардуков Н. В., Феофилов А. В., Глазко Т. Т., Глазко В. И. ISSR-PCR маркеры и мобильные генетические элементы в геноме домашней лошади *Equus caballus*. *Сельскохозяйственная биология.* 2014. №. 4. С. 42–57.

4. Феофилов А. В., Бардуков Н. В., Глазко В. И. Дифференциация генофондов алтайской и рысистых пород лошадей по ISSR-PCR маркерам. *Генетика.* 2011. Т. 37, № 9. С. 1230–1235.

5. Raniaet A. Tahseen, Karam A. Amein, Dalia H. Samak, Yasser S. El-Sayed, Sherif M. Nasr Verifying parentage and genetic variability among Arabian horse using ISSR markers. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences.* 2018. Vol. 59 (1). P. 125–33. DOI:10.5455/ajvs.7699

6. Донт Ю. У., Тимарова А. В., Комарова Л. В., Боронникова С. В. Генетический полиморфизм трех пород лошади домашней. *Вестник Пермского университета. Серия Биология.* 2018. №. 1. С. 50–56.

7. Куриленко Ю. Ф., Супрун И. А. Оценка межпородной дифференциации лошадей при использовании ISSR-маркеров. *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства* : сб. науч. тр. Горки : БГСХА, 2014. Вып. 17, ч. 2. С. 89–96.

8. Столповский Ю. А., Лазебный О. Е., Столповский К. Ю., Сулимова Г. Е. Применение метода ISSR-PCR для оценки популяционной структуры, идентификации и сходства генофондов пород и видов domesticiрованных животных. *Генетика.* 2010. Т. 46, № 6. С. 825–833.

9. Мохначова Н. Б., Стародуб Л. Ф., Добрянська М. Л. Оптимізація методу виділення ДНК з вкопних решток. *Розведення і генетика тварин.* Київ, 2020. Вип. 60. С. 110–115. DOI:10.31073/abg.60.14

10. PIC calculator : вебсайт. URL: <http://www.liv.ac.uk/~kempsj/pic.html>

11. Сулимова Г. Е., Кол Н. В., Рузина М. Н., Столповский К. Ю., Воронкова В. Н., Бояринцева И. С., Столповский Ю. А. Разработка универсального метода оценки генетического разнообразия и паспортизации пород и популяций domesticiрованных видов животных. *Молекулярная и прикладная генетика* : сб. науч. тр. 2011. Т. 12. С. 19–27.

REFERENCES

1. Shubitowski, D. M., P. J. Venta, C. L. Douglass, R. X. Zhou, and S. L. Ewart. 2001. Polymorphism identification within 50 equine gene-specific sequence tagged sites. *Anim Gene.* 32(2):78–88. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2001.00738.x (in English).

2. Caetano-Anolles, G., P. M. Gresshoff. 1996. Generation of sequence signatures from DNA amplification fingerprints with mini-hairpin and microsatellite primers. *Biotechniques*, 20(6):1044–1048 (in English).

3. Bardukov, N. V., A. V. Feofilov, T. T. Glazko, and V. I. Glazko. 2014. ISSR-PCR markery i mobilnye element v genome domashnei loshadi (*Equus caballis*) – ISSR-PCR markers and mobile genetic elements in horse (*Equus caballis*) genome. *Selschohozjastvennaja biologija – Agricultural biology.* 4:42–57 DOI: 10/15389/agrobiology.2014/4/42 (in Russian).

4. Feofilov, A. V., N. V. Bardukov, and V. I. Glazko. 2011. Differentsiatsiya genofondov altayskoy i rysistykh porod loshadey po ISSR-PCR markeram – Differentiation of gene pools of Altai and trotting horse breeds by ISSR-PCR markers. *Genetika – Genetics.* 37(9):1230–1235 (in Russian).

5. Rania, A. Tahseen, Karam A. Amein, Dalia H. Samak, Yasser S. El-Sayed, Sherif M. Nasr. 2018. Verifying parentage and genetic variability among Arabian horse using ISSR markers. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. 59(1):125–133 DOI:10.5455/ajvs.7699 (in English).
6. Dont, Ju. U., A. V. Timarova, L. V. Komarova, and S. V. Boronnikova. 2018. Geneticheskij polimorfizm treh porod loshadi domashnej – Genetic polymorphism of three breeds of the domestic horse *Vestnik Permskogo universiteta – Perm University Bulletin*. 1:50–66. DOI:10.17072/1994-9952-2018-1-50-56 (in Russian).
7. Kurilenko, Yu. F., I. A. Suprun. 2014. Otsenka mezhpородnoy differentsiatsii loshadey pri ispol'zovanii ISSR-markerov – Assessment of interbreed differentiation of horses using ISSR-markers. *Aktual'nyye problemy intensivnogo razvitiya zhivotnovodstva. Gorki – Actual problems of intensive development of animal husbandry. Gorki*. 17(2):89–96 (in Russian).
8. Stolpovskiy, Yu. A., O. E. Lazebny, K. Yu. Stolpovskiy, and G. E. Sulimova. 2010. Prime-neniye metoda issr-pcr dlya otsenki populyatsionnoy struktury, identifikatsii i skhodstva genofondov porod i vidov domestitsirovannykh zhivotnykh – Application of the issr-pcr method to assess the population structure, identification and similarity of gene pools of breeds and species of domesticated animals. *Genetika – Genetics*. 46(6):825–883 (in Russian).
9. Mokhnachova, N. B., L. F. Starodub&, M. L. Dobryanska. 2020. Optymizatsiya metodu vydilennya DNK z vykopnykh reshtok – Optimization of the method of DNA isolation from fossils. *Rozvedennya i henetyka tvaryn – Animal Breeding and Genetics*. 60:110–115. <https://doi.org/10.31073/abg.60.14> (in Ukrainian).
10. PIC calculator, [Electronic resource]. Access mode: <http://www.liv.ac.uk/-kempsj/pic.html>.
11. Sulimova, G. E., N. Kol, M. Rusina, K. Stolpovsky, V. Voronkova, I. Boyarintseva, Yu. Stolpovsky. 2011. Razrabotka universal'nogo metoda otsenki geneticheskogo raznoobraziya i pasportizatsii porod i populyatsiy domestitsirovannykh vidov zhivotnykh – Development of the universal method for estimation of genetic diversity and certify cation of domesticated animal species and populations. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika. Sbornik nauchnykh trudov – Molecular and Applied Genetics*. Collection of scientific papers. 12:19–27 (in Russian).

Одержано редколегією 05.10.2021 р.
Прийнято до друку 23.11.2021 р.