

rebahno bovino de corte / Paim Costa Fernando [et. al.] // Rev. Soc. bras. zootecn. – 1987. – Vol. 16, № 16. – P. 465-469.

30. Kirkpatrick, F. D. The effect of weaning weight and reproduction on profit / F. D. Kirkpatrick // Limousin Journal. – 1981. – Vol. 11, № 4. – P. 446-454.

31. Продолжительность хозяйственного использования коров / М. М. Гаджиев [и др.] // Зоотехния. – 1991. - № 2. – С. 57-58.

32. Lifetime production of beef heifers calving first at two vs three years of age / R. Nunz-Dominguez [et. al.] // J. Anim. Sci. – 1991. – Vol. 69, № 9. – P. 3467-3479.

33. Чохатариди, Г. Экономическая эффективность раннего использования ремонтных тёлочек / Г. Чохатариди // Молочное и мясное скотоводство. – 1997. - № 6. – С. 9-11.

(поступила 26.03.2015 г.)

УДК 575.577:636.1

Ю.Ф. КУРИЛЕНКО, И.А. СУПРУН

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ISSR-МАРКЕРНЫХ СИСТЕМ В КОНЕВОДСТВЕ

Национальный университет биоресурсов и природопользования  
Украины

При использовании метода ISSR-PCR были подобраны наиболее информативные маркерные системы для оценки полиморфизма лошадей 7 популяций (арабской, орловской рысистой, тракненской, новоалександровской тяжеловозной, чистокровной верховой, украинской верховой пород, лошади Пржевальского). Выявлено, что количество продуктов амплификации и их полиморфизм значительно варьируют в зависимости от корового мотива микросателлитов, используемого в качестве праймера. ISSR-S2 и S10 системы являются наиболее информативными для анализа полиморфизма ДНК лошадей, по которым амплифицируется около 20 локусов генома и наблюдается межпородная и внутripородная дифференциация.

**Ключевые слова:** метод ISSR-PCR, маркерные системы, популяция, порода, праймер, полиморфизм ДНК, локусы, межпородная и внутripородная дифференциация.

U.F. KURYLENKO, I.A. SUPRUN

## ISSR-MARKER SYSTEMS USING IN HORSE -BREEDING

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,

By the ISSR-PCR method 7 populations of horses (Arabian breed, the Orlov Trotter, Trakehner, Novoaleksandrovskiy Thoroughbred Horse, Ukrainian horse breed, Przewalski horses) was studied and the most informative ISSR-marker systems was selected. It showed that the number of amplification products and their polymorphism varied considerably depending on the crustal microsatellite motif used as a primer. ISSR-S2 and S10 systems are the most informative for the analysis of DNA polymorphism in horses, on which about 20 amplified genomic loci observed interbreeding and inbreeding differentiation.

**Key words:** ISSR-PCR method, population, horse breed, ISSR-marker systems, polymorphism, primer, DNA polymorphism horses, loci.

**Введение.** Мониторинг генетического полиморфизма популяций является одной из важных составляющих программ сохранения и воспроизводства различных сельскохозяйственных видов, в том числе лошадей. Метод амплификации межмикросателлитных фрагментов ДНК позволяет оценить биологическое разнообразие путём анализа участков ДНК, расположенных между двумя инвертированными SSR-локусами генома (ISSR-PCR) [1, 2, 3, 4]. По сравнению с другими методами мультилокусного профилирования метод ISSR-PCR характеризуется лучшей воспроизводимостью и эффективно используется для выявления внутривидовой и межвидовой генетической изменчивости, идентификации видов и популяций [5, 6].

С этой целью проведён поиск полиморфных ISSR-маркеров для изучения генетического разнообразия популяций лошадей двух видов (*Equus caballus* и *Equus przewalskii*).

**Цель работы** – подбор информативных маркерных систем для ISSR-типирования в коневодстве.

**Материал и методика исследований.** Для проведения исследований были отобраны образцы биологического материала у 176 представителей 7 популяций лошадей (арабской, орловской рысистой, траккененской, новоалександровского тяжеловоза, чистокровной верховой, украинской верховой породы, лошади Пржевальского). Геномную ДНК выделяли из волосяных фолликулов лошадей с собственными модификациями [7] с помощью комплекта реактивов «ДНК-сорб В» (АмплиСенс, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Начальный этап лизиса проводили в течение 2 часов при 65 °С.

Концентрацию ДНК и степень её чистоты определяли с помощью прибора NanoDrop. Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик» (Россия) в следующем температурном режиме: начальная денатурация – 4 мин при температуре 94 °С; 32 цикла: 30 с при 94 °С, 30 с при 58 °С, 2 минут при 72 °С; 5 минут при 72 °С.

Реакционная смесь объёмом 20 мкл содержала: 67 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween-20, 0,2 мМ дНТФ, 1,0 ед. Tag-полимеразы, 40-80 нг ДНК, 1,5-1,8 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,4-0,5 мкМ праймера. Оптимальную концентрацию каждого из компонентов реакции подбирали экспериментально.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1,5%-ном агарозном геле, используя 0,5 × TBE-буфер при постоянном напряжении 100 В в течение 80 минут. После окончания электрофореза гель обрабатывали бромистым этидием (0,5 мкг / мл), визуализировали под УФ-лучами и фотографировали цифровой камерой Panasonic DMC-FS42. Для определения молекулярной массы использовали маркер GeneRuler 100 bp («Fermentas», Литва).

**Результаты эксперимента и их обсуждение.** Праймеры, которые были выбраны нами для проведения исследований на начальных этапах запланированной работы и отвечали требованиям получения спектров ампликонов высокой воспроизводимости и специфичности для оценки межпородной дифференциации, генетической гетерогенности популяций, были использованы рядом авторов на других биологических объектах сельскохозяйственного назначения [3, 8, 9]: S1 – (CTC)<sub>6</sub>A, S2 – (AGC)<sub>6</sub>G, S3 – (TCG)<sub>6</sub>G, S4 – (CTC)<sub>6</sub>C, S5 – (GAG)<sub>6</sub>G, S6 – (GTG)<sub>6</sub>A, S7 – (CCA)<sub>6</sub>G, S8 – (GCT)<sub>6</sub>A, S9 – (AGC)<sub>6</sub>C, S10 – (ACC)<sub>6</sub>G.

В исследованиях некоторых авторов [10, 11] выявлено, что использование праймеров к трехнуклеотидным микросателлитным повторам позволяет получить спектр с большим количеством фрагментов, в том числе и полиморфных по сравнению с динуклеотидными.

Согласно анализу данных, полученных при использовании метода ISSR-PCR, нами был сделан вывод о существовании универсальных праймеров, способных к выявлению генетического полиморфизма не только на уровне различных видов, но и других таксономических единиц. Таким универсальным праймером ПЦР-анализа является фрагмент микросателлитных локусов с коровой последовательностью (AGC), на основе которого были созданы праймеры S2 и S9, оказавшиеся пригодными к определению внутри- и межпородного полиморфизма генома лошадей.

На первом этапе нашей научной работы проведён скрининг 10-ти маркерных систем на основе трехнуклеотидных праймеров с различными коровыми последовательностями и якорными нуклеотидами на 3'-конце (таблица 1).

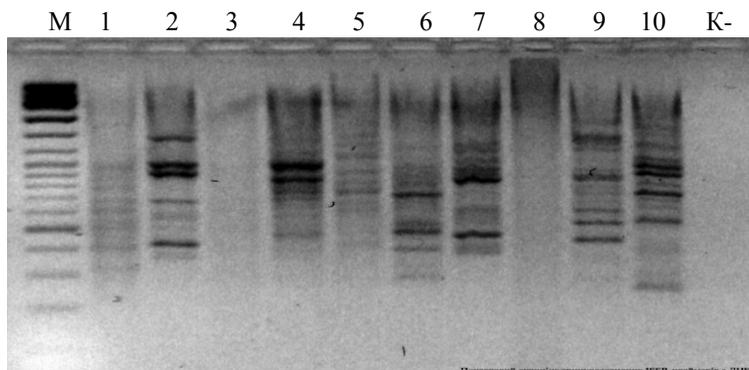
Таблица 1 – Характеристики использованных праймеров

№	Праймер	Повтор	Нуклеотидная последовательность 5→3
S1	(CTC) <sub>6</sub> A	(CTC) <sub>6</sub>	CTC CTC CTC CTC CTC CTC A
S2	(AGC) <sub>6</sub> G	(AGC) <sub>6</sub>	AGC AGC AGC AGC AGC AGC G
S3	(TCG) <sub>6</sub> G	(TCG) <sub>6</sub>	TCG TCG TCG TCG TCG TCG G
S4	(CTC) <sub>6</sub> C	(CTC) <sub>6</sub>	CTC CTC CTC CTC CTC CTC C
S5	(GAG) <sub>6</sub> G	(GAG) <sub>6</sub>	GAG GAG GAG GAG GAG GAG G
S6	(GTG) <sub>6</sub> A	(GTG) <sub>6</sub>	GTG GTG GTG GTG GTG GTG A
S7	(CCA) <sub>6</sub> G	(CCA) <sub>6</sub>	CCA CCA CCA CCA CCA CCA G
S8	(GCT) <sub>6</sub> A	(GCT) <sub>6</sub>	GCT GCT GCT GCT GCT GCT A
S9	(AGC) <sub>6</sub> C	(AGC) <sub>6</sub>	AGC AGC AGC AGC AGC AGC C
S10	(ACC) <sub>6</sub> G	(ACC) <sub>6</sub>	ACC ACC ACC ACC ACC ACC G

Низкие значения PIC (polimorphic index content) при типировании

по САС маркерам у лошадей, полученные В.Н. Воронковой [11] позволили нам исключить эту коровью последовательность из перечня проанализированных нами праймеров. В то же время в исследованиях данного автора при ISSR-типировании лошадей наилучшим образом зарекомендовали себя GAG и ACC маркеры.

Спектры амплификации продуктов ISSR-PCR, полученные в результате первоначального скрининга праймеров, имели следующие характеристики: отсутствие ампликонов, диффузные спектры без чётких дискретных полос и спектры с четкими ПЦР-продуктами (рисунок 1).



М – маркер молекулярных размеров (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas),  
 1 – праймер  $(CTC)_6A$ , 2 –  $(AGC)_6G$ , 3 –  $(TCG)_6G$ , 4 –  $(CTC)_6C$ , 5 –  $(GAG)_6G$ ,  
 6 –  $(GTG)_6A$ , 7 –  $(CCA)_6G$ , 8 –  $(GCT)_6A$ , 9 –  $(AGC)_6C$ , 10 –  $(ACC)_6G$

Рисунок 1 – Скрининг ISSR-праймеров с трехнуклеотидными коровыми последовательностями

По результатам проведённого скрининга праймеры S3 и S8 оказались непригодными для оценки генетического полиморфизма, поскольку не воспроизводили ПЦР-продукта. Объяснить это можно отсутствием в геноме исследованных лошадей микросателлитных локусов с таким количеством повторов или особенностью их образования и эволюции (наличие несовершенных повторов).

Для праймеров S1 и S5 были характерны диффузные спектры без чётких дискретных полос. Ввиду того, что ПЦР позволяет эффективно амплифицировать локусы, расстояние между которыми составляет не более 3 тыс. п.н., такая картина может свидетельствовать о расположении инвертированных локусов на большем расстоянии друг от друга. Отсутствие дискретных полос при электрофоретическом разделении может быть связано также с большим количеством этих микросателлитов в геномах.

С использованием праймеров S2, S4, S6, S7, S9, S10 были получены чёткие зоны амплификации. Однако в дальнейшем для оценки внутривидового полиморфизма лошадей мы применяли маркерные системы (S2, S6, S9, S10), имеющие сравнительно большее количество локусов. Общее количество ампликонов варьировало в зависимости от микросателлитных последовательностей праймера и якорного нуклеотида.

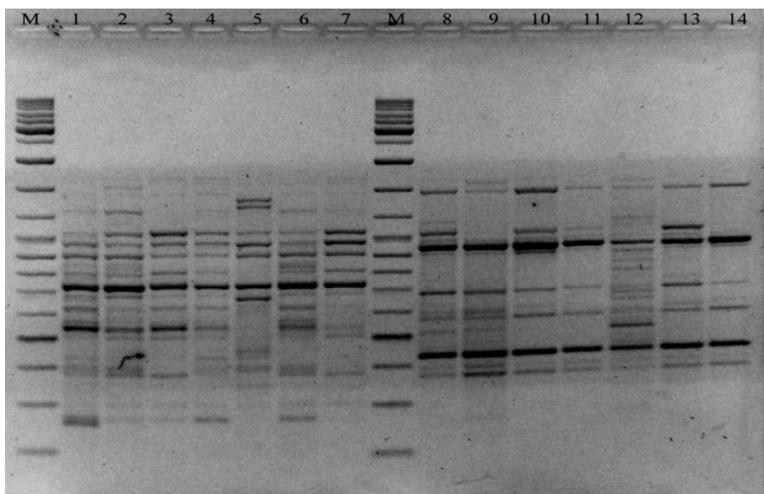
При повторной амплификации геномной ДНК одного и того же животного не всегда воспроизводится весь спектр продуктов амплификации. Для анализа использовали только чёткие ПЦР-локусы, которые воспроизводились не менее чем в 3-4 независимых экспериментах. Диффузные, низкомолекулярные фрагменты длиной 80-150 п.н., которые не воспроизводились при повторных экспериментах, нами не учитывались. Каждый продукт амплификации рассматривали как отдельный локус.

Всего при использовании 4 ISSR-праймеров было получено 74 продукта амплификации ДНК лошадей, 54 из которых (72,97 %) были полиморфными (таблица 2).

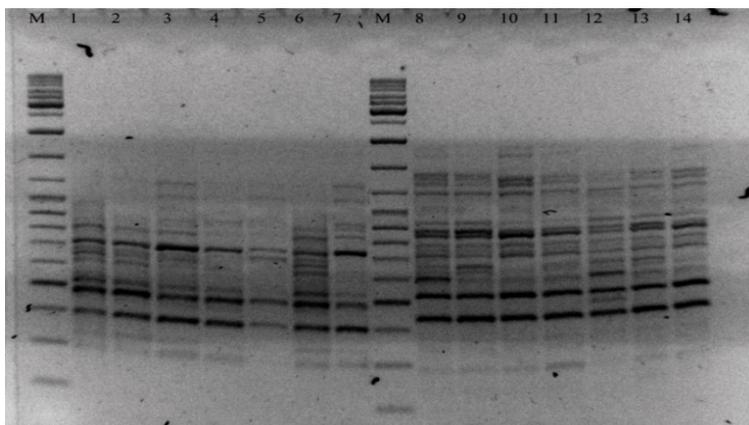
Таблица 2 – Общая характеристика ISSR-ампликонов лошадей

Маркерная система	Праймер	Общее количество локусов	Количество полиморфных локусов	Уровень полиморфизма, %	PIC	Маркерный индекс
S2	(AGC) <sub>6</sub> G	19	15	76,47	0,2	3,9
S6	(GTG) <sub>6</sub> A	14	11	78,57	0,2	3,5
S9	(AGC) <sub>6</sub> C	17	9	46,67	0,1	2,5
S10	(ACC) <sub>6</sub> G	24	19	79,17	0,2	5,7
	Σ	74	54	72,97	0,2	-

Общее количество ПЦР-локусов варьировало от 24 (для праймера (ACC)<sub>6</sub>G) до 14 (для праймера (GTG)<sub>6</sub>A), количество полиморфных локусов – от 19 ((ACC)<sub>6</sub>G) до 9 ((AGC)<sub>6</sub>C). Примеры полученных спектров амплификации приведены на рисунках 2-3.



М – маркер молекулярных размеров (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas),  
 1, 8 – арабская, 2, 9 – лошади Пржевальского, 3, 10 – орловская рысистая,  
 4, 11 – тракененская, 5, 12 – новоалександровский тяжеловоз,  
 6, 13 – чистокровная верховая, 7, 14 – украинская верховая порода  
 Рисунок 2 – Электрофореграмма разделения продуктов амплификации  
 ISSR-PCR лошадей при использовании праймеров  $(ACC)_6G$  (1-7) и  
 $(AGC)_6G$  (8-14)



1, 8 – арабская, 2, 9 – лошади Пржевальского, 3, 10 – орловская рысистая,  
 4, 11 – тракененская, 5, 12 – новоалександровский тяжеловоз,  
 6, 13 – чистокровная верховая, 7, 14 – украинская верховая порода  
 Рисунок 3 – Электрофореграмма разделения продуктов амплификации  
 ISSR-PCR с ДНК лошадей при использовании праймеров  
 $(GTG)_6A$  (1-7) и  $(AGC)_6C$  (8-14)

Весь спектр продуктов амплификации разделили на 3 части: область «тяжёлых» фрагментов (более 1000 п.н.), включавшая в себя наиболее длинные фрагменты ДНК, область ампликонов среднего диапазона (500-1000 п.н.) и наиболее короткие низкомолекулярные фрагменты размером 300-500 п.н. При использовании праймера (ACC)<sub>6</sub>G получено наибольшее общее количество ПЦР-бэндов, наибольшее количество полиморфных ампликонов – 24 и 19 соответственно и высокий уровень полиморфизма (79,17 %) среди всех использованных в работе ISSR-праймеров. Длина полученных продуктов ПЦР находилась в диапазоне от 260 до 1430 п.н. В спектрах праймера (ACC)<sub>6</sub>G преобладали продукты ПЦР со средним размером 500-1500 п.н. – 63,16%, доля низкомолекулярных ампликонов размером менее 500 п.н. составила 36,84 %.

При использовании праймера (AGC)<sub>6</sub>G с ДНК лошадей различных пород получено 19 продуктов амплификации, 15 из которых (76,47 %) были полиморфными. Длина ампликонов составляла 270-1400 п.н. Подавляющее большинство ПЦР-локусов, полученных с этим праймером, были среднего размера, что составляло 83,33 % от общего количества локусов. Четыре ПЦР-локуса были длиной менее 500 п.н. (16,67 %).

В мультилокусных спектрах амплификации праймера (GTG)<sub>6</sub>A было получено 14 воспроизводимых ПЦР продуктов размером от 300 п.н. до 1120 п.н., 11 из которых оказались полиморфными и имели длину, соответствующую среднему диапазону. Таким образом, уровень полиморфизма для спектров с этим праймером и доля ПЦР-локусов среднего диапазона (11) составили 78,57 %.

Одним из наиболее распространённых показателей информативности маркеров, полученных при использовании того или иного ПЦР-метода, является маркерный индекс (МИ). Этот показатель позволяет учитывать мультилокусность спектров амплификации ДНК фингерпринту с использованием полимеразной цепной реакции.

Наименьшее количество полиморфных ампликонов (9) и низкое значение маркерного индекса (2,5) получено с праймером (AGC)<sub>6</sub>C, уровень полиморфизма составил 46,67 %. Всего при использовании этого праймера ISSR-спектры состояли из 17 продуктов ПЦР длиной 420-1450 н.п. Как и в случае предыдущего праймера, подавляющее большинство ПЦР-локусов (15) имели средний размер (500-1500 п.н.), что составило 88,24 % от общего количества локусов. Доля локусов с наименьшими размерами до 500 п.н. составила 11,76 %.

Анализ спектров продуктов амплификации участков между инвертированными повторами микросателлитных локусов осуществляли при использовании трехнуклеотидных праймеров с последовательностями: (ACC)<sub>6</sub>G, (AGC)<sub>6</sub>G, (GTG)<sub>6</sub>A и (AGC)<sub>6</sub>C. Следует отметить, что

для всех протестированных праймеров ((ACC)<sub>6</sub>G, (AGC)<sub>6</sub>G, (GTG)<sub>6</sub>A и (AGC)<sub>6</sub>C) не обнаружены воспроизводимые ампликоны с размером более 1500 п.н. Значение маркерного индекса варьировало в зависимости от праймера. Высокие значения маркерного индекса получили для праймеров (ACC)<sub>6</sub>G (5,7) и (AGC)<sub>6</sub>G (3,9), что свидетельствует о большей информативности данных ISSR-праймеров для дифференцирования исследованных популяций лошадей. Для других двух праймеров величина МКИ была достоверно ниже ( $p < 0,05$ , таблица 2).

**Заключение.** Таким образом, установлено, что количество продуктов амплификации (спектры ампликонов) и их полиморфизм значительно варьируют в зависимости от корового мотива микросателлитов, используемого в качестве праймера. ISSR-S2 и S10 системы являются наиболее информативными для анализа полиморфизма ДНК лошадей, по которым амплифицируется около 20 локусов генома и наблюдается межпородная и внутривидовая дифференциация.

#### Литература

1. Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using triand tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (Brassica oleracea var. botrytis L.) / B. Bornet [et al.] // Genome. – 2002. – Vol. 45. – P. 890-896.
2. Zietkiewicz, E. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genomics. – 1994. – Vol. 20. – P. 176-183.
3. Бардуков, Н. В. Профили ДНК-маркеров (ISSR-PCR) у лошадей рысистых пород / Н. В. Бардуков, Г. К. Коновалова, В. И. Глазко // Известия ТСХА. – 2010. – № 6. – С. 152-157.
4. Метлицька, О. І. Методологія ДНК-паспортизації геофондів сільськогосподарських тварин за гіперваріабельними локусами геному : дис. ... д-ра с.-г. наук : 03.00.15 / Метлицька Олена Іванівна. – Полтава, 2012. – 382 с.
5. Применение межмикросателлитного анализа ДНК для оценки популяционной структуры, идентификации и сходства геофондов пород и видов domestизированных животных / Ю. А. Столповский [и др.] // Генетика. – 2010. – Т. 46, № 6. – С. 825-833.
6. Феофилов, А. В. Дифференциация геофондов алтайской и рысистых пород лошадей по ISSR-PCR маркерам / А. В. Феофилов, Н. В. Бардуков, В. И. Глазко // Генетика. – 2011. – Т. 47, № 9. – С. 1230-1235.
7. Korbin, M. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR / M. Korbin, A. Kuras, E. Zurawicz // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2002. – Vol. 7. – P. 785-794.
8. Березовская, О. П. Внутри- и межвидовые различия в ISSR-PCR характеристике шмелей (HYMENOPTERA: BOMBINAE) / О. П. Березовская, О. Ю. Мороз, А. П. Сидоренко // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 3. – С. 28-35.
9. Глазко, В. И. Введение в ДНК технологии и биоинформатику / В. И. Глазко, Г. В. Глазко – К., 2001. – 544 с.
10. Kuhl, D. P. A. Trinucleotide repeats and genome variation / D. P. A. Kuhl, C. T. Caskey // Curr Opin Genet. Dev. – 1993. – Vol. 3. – P. 404-407.
11. Воронкова, В. Н. Сравнительный анализ информативности ISSR-маркеров для оценки генетического разнообразия пород лошадей / В. Н. Воронкова, Цэндсүрэн Цэдэв, Г. Е. Сулимова // Генетика. – 2011. – Т. 47, № 8. – С. 1131-1134.

(поступила 10.03.2015 г.)