

А.В. ГОРОДНАЯ, В.И. ГЛАЗКО

Институт агроэкологии УААН, Киев

ПОЛИМОРФИЗМ СТРУКТУРНЫХ ГЕНОВ И ISSR-PCR МАРКЕРОВ ПРИ ПОПУЛЯЦИОННО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ НЕКОТОРЫХ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА



Выполнен сравнительный анализ генетических структур пяти пород крупного рогатого скота по полиморфизму двух разных типов молекулярно-генетических маркеров — 25 структурным генам и 128 ДНК-локусам (фрагментам ДНК, фланкированным инвертированными повторами микросателлитных локусов — ISSR-PCR метод). Несмотря на наличие породоспецифичных особенностей по распределению генотипов, уровень средней гетерозиготности по структурным генам был близок у всех исследованных пород. Доля полиморфных локусов и усредненное значение полиморфного информационного содержания (PIC) ISSR-PCR маркеров оказалось существенно выше у заводских пород с высокой эффективной численностью по сравнению с украинскими аутохтонными породами. Обсуждаются популяционно-генетические процессы, выявляемые разными методами.

© А.В. ГОРОДНАЯ, В.И. ГЛАЗКО, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 1

Введение. В популяционно-генетических исследованиях достаточно давно обсуждается возможное значение средней гетерозиготности для прогноза стабильности рассматриваемой популяции. Предполагается, что популяция имеет некий «оптимум» гетерозиготности, отклонения от которого могут сигнализировать о процессах генофондной деградации [1–3]. Однако эти выводы были сделаны на основании анализа полиморфизма структурных генов в основном по гетерозиготности электрофоретических вариантов белков и ферментов. В последние годы в популяционной генетике широкое использование получили новые методы прямого исследования полиморфизма различных участков ДНК, такие как полиморфизм фрагментов рестрикции (RFLP), микросателлитные локусы (SSR), фрагменты ДНК, фланкированные инвертированными повторами случайных декануклеотидов (RAPD), или последовательности микросателлитов (ISSR). Преимущества этих методов обусловлены тем, что они позволяют получать многолокусные и высокополиморфные спектры фрагментов генома, однако к их недостаткам следует отнести доминантный характер наследования. Относительно повышенный (по сравнению со структурными генами) полиморфизм ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) маркеров может быть обусловлен высокой частотой мутирования по микросателлитным локусам, которые используются в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (PCR). Так, по опубликованным данным [4], частота мутационных событий по микросателлитным локусам в среднем в 1000 раз выше, чем по структурным генам. ISSR-PCR маркеры характеризуются широким спектром продуктов амплификации (ампликонов), каждый из которых рассматривается как отдельный локус. Кроме того, принято считать, что микросателлитные локусы относительно равномерно распределены по всему геному и широко представлены как в кодирующих, так и не кодирующих последовательностях [5]. Поэтому оценка полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов, может более объективно отражать внутривидовое генетическое разнообразие, чем полиморфизм только структурных генов, которые выявляются по аминокислотным заменам, меня-

ющим общий заряд белка и приводящим к появлению их электрофоретических вариантов.

Для того чтобы оценить внутривидовой размах изменчивости по генетическому разнообразию и зависимость такой оценки от метода выявления полиморфизма, в настоящем исследовании выполнено сравнение генетических структур пяти пород крупного рогатого скота по генетико-биохимическим системам (электрофоретическим вариантам белков и ферментов) и ISSR-PCR маркерам. Такое сравнение позволяет оценить информативность этих разных «поколений» молекулярно-генетических маркеров при описании внутрипопуляционного генетического разнообразия, а также межгрупповых, межпопуляционных отличий по генетической структуре.

Материалы и методы. В анализ включены образцы крови пяти пород крупного рогатого скота: серой украинской (СУ): исследовано 34 головы, животных содержали в хозяйстве заповедника Аскания-Нова с. Маркеево Херсонской области, белоголовой украинской (БУ) — 35 голов исследовано из хозяйства совхоза «Антонины» Хмельницкой области, голштинской (Г) — 46 голов из элевейера Эрастовской опытной станции Днепропетровской области, лебединской (Л) — 30 голов скота из хозяйства Тов. «Урожай» Сумской области, красной степной (КС) — 30 голов из хозяйства им. Фрунзе Кировоградской области.

Оценивали полиморфизм 18 генетико-биохимических систем (23 локуса) с использованием метода электрофоретического разделения белков. Изучали полиморфизм следующих генетико-биохимических систем: транспортные белки — гемоглобин (НВ), церулоплазмин (СР), трансферрин (ТФ), посттрансферрин-2 (РТФ-2), рецептор к витамину D (ГС); ферменты внутриклеточного энергетического метаболизма — лактатдегидрогеназа (LDH) два локуса, глюкозофосфат изомераза (GPI), аденилаткиназа (АК) два локуса, гексокиназа (НК) два локуса, малатдегидрогеназа (MDH), малик энзим (МЕ), изоцитратдегидрогеназа (IDH), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-PGD), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G-6-PD); ферменты метаболизма экзогенных субстратов — эстераза плазмы (EST) два локуса, амилаза-1 (АМ1), креатинкиназа (КК) два ло-

куса, диафороза (DP) два локуса. Локализация по хромосомам генома [14] и функции данных генетико-биохимических систем установлены и описаны ранее [15].

Электрофоретическое разделение белков и ферментов крови выполняли в крахмальных гелях с последующим гистохимическим окрашиванием, а также использовали метод вертикального гель-электрофореза в полиакриламидном геле [6] с собственными модификациями. Полиморфизм структурных генов каппа-казеина (CSN3) и бета-лактоглобулина (BLG) выявляли с использованием метода RFLP-PCR. Для амплификации фрагмента гена CSN3 использовали праймеры *Vokas A* 5'-GAAATCCCTA CCAATCAATACC-3' и *Vokas B* 5'-CCATCTAC GCTAGTTTAGATG-3'. Для выявления аллельных вариантов А и В гена CSN3 продукт амплификации обрабатывали рестриктазой *Hin*PI [7].

Для амплификации фрагмента гена BLG использовали праймеры 5'-TGTGCTTTTGG ACACCGACTACA AAAA-3' и 5'-GCTCCCGG TATATGACCACCCTCT-3'. Праймеры были подобраны таким образом, чтобы амплифицированный фрагмент включал в себя сайты распознавания рестриктазой *Not*III [8]. Продукты рестрикции разделяли методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Для оценки полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов [9], в качестве праймеров использовали четыре фрагмента тринуклеотидных микросателлитных локусов — (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AGC)₆G, (CTC)₆C. Из каждой породы для исследования полиморфизма ISSR-PCR маркеров брали до 16 особей. Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови животных по стандартной методике [10]. Продукты амплификации получали, используя принятую для PCR методику [11]. Разделяли ампликоны по молекулярной массе в 0,8- и 2%-ном агарозных гелях методом горизонтального электрофореза, используя для окраски фрагментов ДНК раствор бромистого этидия. Визуализацию фрагментов ДНК проводили в УФ свете и фотографировали на пленку (Микрат-300). Размеры фрагментов ДНК определяли при

помощи маркера молекулярных масс 0,1-kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Для математической обработки данных использовали компьютерные программы «Statistica» и «BIOSIS-1».

Результаты исследований и их обсуждение. Для сравнительной внутривидовой оценки крупного рогатого скота изначально исследовали полиморфизм генетико-биохимических систем внутри пород. В результате среди особей пяти пород крупного рогатого скота из исследованных 25 структурных генов по 8 выявили полиморфизм, а 17 оказались мономорфными. Анализ частот аллелей полиморфных локусов гетерозиготных генотипов позволил рассчитать гетерозиготность по каждому локусу и среднюю гетерозиготность. Выявляли специфику распределения аллельных вариантов полиморфных локусов, характерную для отдельных пород. Оказалось, что наибольший вклад в общую гетерозиготность всех исследованных пород вносил локус трансферрина (TF), а сре-

ди исследованных пород у серой украинской по этому локусу выявлено наибольшее количество гетерозиготных особей. Локус гемоглобина был полиморфен только у лебединской и красной степной пород. Наибольшее количество гетерозигот по локусу церулоплазмينا (CP) и бета-лактоглобулина (BLG) обнаружено у лебединской породы, а по локусу каппаказеина (CSN3) гетерозиготные генотипы чаще всего встречались у серой украинской породы (табл. 1).

Средняя гетерозиготность на полиморфный локус у исследованных пород крупного рогатого скота колебалась в пределах от 0,393 до 0,488 у серой украинской и белоголовой украинской соответственно (табл. 1). Средняя гетерозиготность по всем исследованным локусам, включая мономорфные, была существенно ниже (от 0,126 до 0,156; табл. 1). Обращают на себя внимание близкие значения уровней средней гетерозиготности, рассчитанных по полиморфным и суммарно по всем локусам у

Таблица 1

Распределение гомозиготных и гетерозиготных генотипов полиморфных локусов у исследованных пород крупного рогатого скота, %

Локус	Генотипы	Серая украинская	Белоголовая украинская	Голштинская	Лебединская	Красная степная
TF	M	15	31	22	27	37
	N	85	69	78	73	63
HB	M	100	100	100	87	93
	N	—	—	—	13	7
PTF2	M	56	34	53	70	33
	N	44	66	47	30	67
GC	M	65	37	39	100	33
	N	35	63	61	—	67
CP	M	65	71	46	33	74
	N	35	29	54	67	26
AML	M	85	37	61	47	33
	N	15	63	39	53	67
BLG	M	85	29	38	25	50
	N	15	71	62	75	50
CSN3	M	15	71	69	25	75
	N	85	29	31	75	25
$H_{n/i}$	$H_{cp} = 45,9$	39,3	48,8	46,5	48,3	46,5
$H_{n/\Sigma}$	$H_{cp} = 14,7$	12,6	15,6	14,9	15,5	14,9

Примечание. M — гомозиготы; N — гетерозиготы; $H_{n/i}$ — средняя наблюдаемая гетерозиготность на полиморфный локус; $H_{n/\Sigma}$ — средняя наблюдаемая гетерозиготность на исследованный локус.

Таблица 2

Вклад ампликонов разной длины в спектры ISSR-PCR у пород крупного рогатого скота при использовании в качестве праймеров фрагментов разных микросателлитных локусов, %

Длины ампликонов	Серая украинская	Белоголовая	Голштинская	Лебединская	Красная степная	N_{cp}
(ACC) _n G						
3250—1550	25	33	27	32	47	32,8
1550—1000	31	39	27	31	20	29,6
1000—320	44	28	46	37	33	37,6
(GAG) _n C						
3250—1550	24	22	18	0	0	12,8
1550—1000	35	39	35	40	29	35,6
1000—320	41	39	47	60	71	51,6
(AGC) _n G						
3250—1550	38	19	19	28	—	26
1550—1000	19	31	50	44	—	36
1000—320	44	50	31	28	—	38,3
(CTC) _n C						
3250—1550	50	50	38	32	55	45
1550—1000	19	8	50	31	18	25,2
1000—320	31	42	13	37	27	30

Примечание. N_{cp} — усредненное значение количества ампликонов по группам длин ампликонов.

исследованных пород, несмотря на существенные отличия между породами по гетерозиготности отдельных локусов, например таким, как рецептор витамина Д (GC), BLG, CSN3. Из представленных данных видно, что породы существенно отличаются друг от друга по распределению аллельных вариантов, частотам генотипов исследованных структурных генов, однако усредненные значения средней гетерозиготности оказываются у этих пород достаточно близки друг к другу.

Далее генетическая структура пород была проанализирована с использованием ISSR-PCR маркеров (фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором участка микросателлитного локуса, который используется в полимеразной цепной реакции в качестве одного праймера). В анализ полиморфизма по ISSR-PCR маркерам вошло меньшее количество животных, чем по структурным генам, однако было рассмотрено существенно большее количество локусов. При PCR с использованием в качестве одного праймера получали спектры ряда продуктов амплификации (ампликонов) фрагментов ДНК в отличие

от структурных генов, анонимных по нуклеотидной последовательности (за исключением их флангов), локализации в геноме и биохимической функции. Один ампликон спектра рассматривали как один локус ДНК. Полиморфизм такого локуса оценивали по наличию / отсутствию ампликона соответствующей длины в спектрах.

Выполнен сравнительный анализ (ISSR-PCR) спектров ампликонов, полученных в результате использования различных праймеров: оценивали количество продуктов амплификации (ампликонов) в спектрах, долю полиморфных локусов, «полиморфное информационное содержание» (PIC — polymorphism information contents) спектров, возможность по результатам анализа выявить породные отличия у рассмотренных пяти пород крупного рогатого скота.

При использовании четырех тринуклеотидных праймеров в ISSR-PCR спектрах наблюдали от 8 до 35 ампликонов. Наибольшее количество ампликонов у всех пород располагалось в пределах длин 2600—520 п.о. Ампликоны условно можно разделить на следующие группы:

наибольшей длины — 3250—1550 п.о., промежуточной — 1550—1000 п.о. и «легкие» фрагменты — 1000—330 п.о. Отмечается неодинаковая представленность ампликонов этих групп у исследованных животных в зависимости от нуклеотидной последовательности праймера. Так, если праймерами были последовательности (ACC)₆G и (AGC)₆G, то наблюдали тенденцию к относительно повышенной встречаемости ампликонов малой длины (табл. 2). В случае праймера (GAG)₆C в спектрах всех пяти пород обнаруживали отчетливое преобладание «легких» ампликонов, а при использовании в качестве праймера фрагмента микросателлитного локуса (CTC)₆C в спектрах относительно преобладали ампликоны из области длин в 3250—1550 п.о. (табл. 2).

Фрагмент микросателлитного локуса (ACC)₆G позволил суммарно у пяти пород получить 44 ампликона в пределах длин 2950—320 п.о. Необходимо отметить породную специфичность получаемых спектров у исследованных пород. Так, например, только 11,4 % всех выявленных ампликонов присутствовали в спектрах у всех исследованных пород, из которых один локус оказался полиморфным у всех пород, а по четырем локусам у отдельных пород полиморфизм отсутствовал. В спектрах, полученных при использовании этого праймера, обнаружены ампликоны, присутствие которых оказалось породоспецифичным, они встречались только у животных одной из исследованных пород. К таким ампликонам относилось 28,1 % у серой украинской, 11,1 % у белоголовой украинской, 19,2 % у голштинской, 5,3 % у лебединской и 6,7 % у красной степной.

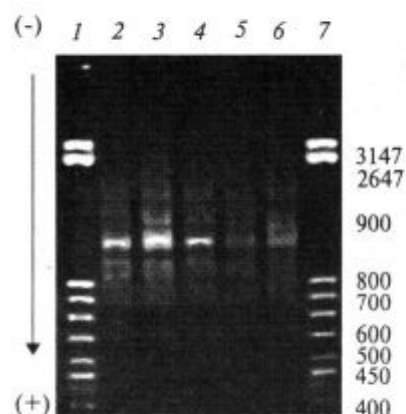


Рис. 1. Спектр амплификации ДНК (ISSR-PCR, праймер (AGC)₆G) голштинской породы крупного рогатого скота: 1, 7 — маркер молекулярной массы; 2—6 — спектры ампликонов ДНК крупного рогатого скота

Внутри каждой породы такие локусы тоже оказывались полиморфными (табл. 3).

Праймер (GAG)₆C суммарно у животных пяти пород позволил выявить 31 локус в спектрах продуктов амплификации. Самое большое количество полиморфных локусов, при использовании этого праймера наблюдали у красной степной породы (табл. 3). Породоспецифичные ампликоны обнаруживали в спектрах только у голштинской (11,8 %) и красной степной (7,1 %) пород; эти локусы внутри данных пород были полиморфными.

При использовании праймера (AGC)₆G получили суммарно у четырех пород 25 ампликонов, из которых 42 % оказались полиморфными (табл. 3). Общими для пород оказались 24 % всех выявленных ампликонов. Породоспецифичные локусы при использовании данного

Таблица 3

Наличие полиморфных локусов в спектре ампликонов (ISSR-PCR метод), полученных при использовании разных праймеров у крупного рогатого скота

Праймер	Серая украинская		Белоголовая украинская		Голштинская		Лебединская		Красная степная	
	<i>n</i>	<i>m</i>	<i>n</i>	<i>m</i>	<i>n</i>	<i>m</i>	<i>n</i>	<i>m</i>	<i>n</i>	<i>m</i>
(ACC) ₆ G	32	97	18	78	27	96	19	63	15	73
(GAG) ₆ C	17	47	18	50	17	47	15	60	14	64
(AGC) ₆ G	16	25	16	13	16	50	18	78	—	—
(CTC) ₆ C	16	94	12	100	8	100	19	21	11	91

Примечание. *n* — количество ампликонов спектра; *m* — количество полиморфных ампликонов спектра, %.

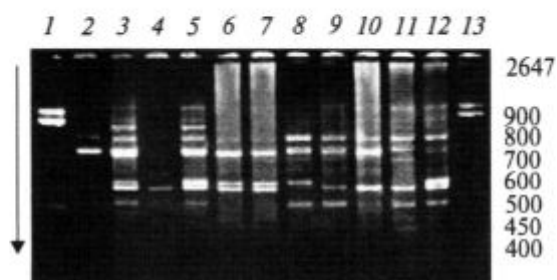


Рис. 2. Спектр амплификации ДНК (ISSR-PCR, праймер (GAG)₆C) серой украинской породы крупного рогатого скота: 1, 13 — маркер молекулярной массы; 2—12 — спектры амплификации ДНК крупного рогатого скота

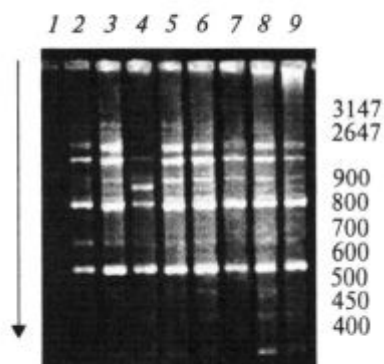


Рис. 3. Спектр амплификации ДНК (ISSR-PCR, праймер (CTC)₆C) лебединской породы крупного рогатого скота: 1 — маркер молекулярной массы; 2—9 — спектры ампликонов ДНК крупного рогатого скота

праймера выявлены у белоголовой украинской (12,5 %) и голштинской (6,3 %) пород.

При использовании в качестве праймера последовательности (CTC)₆C суммарно в спектрах разных пород выявлено 28 ампликонов, 81 % из которых были полиморфными (табл. 3). В многолокусном спектре ампликонов у лебединской породы обнаружен 21 % полиморфных ампликонов; у белоголовой украинской и голштинской пород внутривидовой полиморфизм выявляли по всем ампликонам спектра, причем общим для спектров всех пород оказалось присутствие только одного ампликона, что составило 3,6 % всех ампликонов спектра. Породаспецифичные локусы при использовании данного праймера выявлены у серой украинской породы (12,5 %), у голштинской породы — 25 %, у лебединской — 21,1 %. В общем оказалось, что спектры ампликонов,

полученные при использовании в качестве праймера последовательности (CTC)₆C, были наиболее полиморфными и наиболее существенно отличались у разных пород. По-видимому именно этот праймер является наиболее удобным для выявления породаспецифичных популяционно-генетических отличий, а также для изучения разнообразия генофонда всего вида крупного рогатого скота.

Полученные данные свидетельствуют о том, что каждый праймер в ISSR-PCR методе приводил к формированию спектров продуктов амплификации, специфические особенности которых оказывались связаны как с принадлежностью животных к определенной породе, так и с нуклеотидной последовательностью самого праймера. Так, суммарно наибольшее количество ампликонов было получено при использовании праймеров (ACC)₆G (44 локуса) и (GAG)₆C (31 локус), несколько меньшее — с праймером (AGC)₆G (25 локусов у четырех пород) и (CTC)₆C (28 локусов у пяти пород). В то же время доля полиморфных фрагментов ДНК не была прямо связана с количеством выявляемых локусов. Так, она была наибольшей (в среднем ~81 % полиморфных локусов на породу) в спектрах ампликонов, выявленных с помощью праймеров (ACC)₆G и (CTC)₆C, по сравнению со спектрами, полученными при использовании праймеров (GAG)₆C (в среднем 54 % полиморфных локусов на породу) и (AGC)₆G (41 % полиморфных локусов).

Наибольшие значения доли полиморфных локусов в среднем на один праймер получены для животных голштинской (73 %) и красной степной (76 %) пород с относительно большой эффективной численностью по сравнению с такими украинскими аутохтонными породами, как серая украинская (66 %), белоголовая украинская (60 %) и лебединская (56 %).

Обращают на себя внимание выраженные отличия спектров, полученных при использовании в качестве праймеров последовательностей (GAG)₆C и (CTC)₆C, принадлежащих к так называемым пурин/пиримидиновым трактам, которые способны формировать триплексные структуры, предположительно принимающие участие в регуляции генной экспрессии [12]. При примерно одинаковом количестве ампликонов в спектрах (31 для (GAG)₆C и 28 для

(СТС)₆С) они существенно отличались по доле полиморфных локусов, а также по представленности в спектрах ампликонов разной длины (табл. 2, в спектре (GAG)₆С преобладали «легкие» ампликоны, в спектре (СТС)₆С — «тяжелые»).

По-видимому это может свидетельствовать о повышенной консервативности у исследованных пород крупного рогатого скота коротких фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором (GAG)₆С, по сравнению с фрагментами, фланкированными повтором (СТС)₆С. Во всяком случае полученные данные свидетельствуют о существенных отличиях в распределении этих повторов по геному крупного рогатого скота.

Выполнен расчет индекса PIC по формуле Botsteina et al. [13] для диаллельных локусов, для которых $PIC = 2f(1 - f)$, где f — частота одного из двух аллелей. Поскольку маркеры ISSR-PCR имеют доминантный характер наследования по присутствию продукта амплификации, f рассчитывали по частоте рецессивного аллеля, исходя из доли носителей рецессивных гомозигот среди исследованных животных, соответственно, по формуле \sqrt{R} , где R — количество носителей рецессивных гомозигот, деленное на количество исследованных животных.

Индекс PIC характеризует уровень гетерозиготности локусов — продуктов амплификации. Полученные величины PIC для каждого локуса спектра усредняли по всем ампликонам спектров одного праймера у исследованных пород (табл. 4). Видно, что полученные данные качественно совпадают с результатами

оценки доли полиморфных локусов: наибольшие значения PIC обнаруживаются в спектрах праймеров (ACC)₆G и (СТС)₆С по сравнению с двумя другими праймерами, а также у голштинской и красной степной пород по сравнению с другими породами (табл. 4).

Сравнительный анализ уровней средней гетерозиготности (H) по структурным генам (отдельно только по полиморфным, и суммарно по всем генам, табл. 1) с долей полиморфных локусов по ISSR-PCR маркерам у разных пород свидетельствует о том, что H по структурным генам более однообразно у разных пород, чем по ISSR-PCR маркерам. Причем это не связано с долей полиморфных локусов, поскольку среднее значение PIC по 128 ампликонам (0,244), полученным с использованием всех четырех праймеров, занимает промежуточное положение между значениями средней гетерозиготности, рассчитанными по всем структурным генам (0,147) и только по полиморфным локусам (0,459). Таким образом, сопоставление полиморфизма по 25 локусам, кодирующим генетико-биохимические системы, и 128 локусам — фрагментам ДНК, фланкированным микросателлитными локусами, свидетельствует о сходстве таких оценок. Интересно отметить, что по обоим типам молекулярно-генетических маркеров наблюдается выраженная породная специфичность в распределении генотипов.

Сравнение полиморфизма этих двух разных типов молекулярно-генетических маркеров показало, что усредненные значения полиморфизма структурных генов (H) оказываются

Таблица 4

Значения индекса информационного содержания локуса (ISSR-PCR) у исследованных животных разных пород крупного рогатого скота

Праймер	Количество исследованных животных					PIC
	Серая украинская	Белоголовая	Голштинская	Лебединская	Красная степная	
(ACC) ₆ G	28	11	10	16	13	0,280
(GAG) ₆ С	16	10	12	16	12	0,233
(AGC) ₆ G	6	6	12	16	—	0,162
(СТС) ₆ С	21	7	7	14	7	0,300
PIC — среднее по породам 0,252	0,234	0,200	0,284	0,220	0,321	Среднее по праймерам 0,244

ся сходными у разных пород крупного рогатого скота, несмотря на выраженную породную специфичность по распределению аллелей и гетерозигот по отдельным генам. Это, в общем, соответствует представлениям об «оптимуме» гетерозиготности у пород, обсуждаемым Алтуховым [3]. Однако данные, полученные по ISSR-PCR маркерам, наибольшая доля полиморфных локусов по которым обнаруживается у заводских пород с относительно большой численностью (голландская, красная степная) по сравнению с аутохтонными украинскими породами (серая украинская, белоголовая украинская, лебединская), свидетельствуют о том, что полиморфизм этих двух типов маркеров может качественно отличаться друг от друга. Полиморфизм структурных генов может зависеть от «оптимума» гетерозиготности, при котором полиморфизм одного гена ограничивается полиморфизмом других генов, а полиморфизм фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов, может зависеть от эффективной численности популяции.

Выводы. Сравнительный анализ генетических структур пяти пород крупного рогатого скота по двум типам молекулярно-генетических маркеров (25 структурных генов и 128 локусов — ISSR-PCR маркеров) свидетельствует о сходстве получаемых оценок по средней гетерозиготности. Каждый праймер в ISSR-PCR-методе приводил к формированию спектров продуктов амплификации, специфические особенности которых оказывались связаны как с принадлежностью животных к определенной породе, так и с нуклеотидной последовательностью самого праймера. Использование в качестве праймеров последовательностей (GAG)_nC и (CTC)_nC (пурин/пиримидиновые тракты) является наиболее удобным для выявления породоспецифичных популяционно-генетических отличий. Значения PIC по ISSR-PCR маркерам были выше у заводских пород с относительно большой численностью (голландская, красная степная) по сравнению с аутохтонными (серая украинская, белоголовая украинская, лебединская). Таких отличий не обнаружено по полиморфизму структурных генов. Полученные данные позволяют предполагать, что полиморфизм ISSR-

PCR маркеров может поддерживаться иными механизмами, чем полиморфизм структурных генов.

SUMMARY. The comparative analysis of genetic structures of five cattle breeds has been carried out using polymorphism of two different types of molecular-genetic markers — 20 structural genes and 128 DNA loci (the DNA fragments flanked by inverted microsatellite loci repetitions — ISSR-PCR method). In spite of availability of breed-specific singularities of genotype distribution detected by the both methods the level of mean heterozygosity of structural genes was similar in all the investigated breeds. A part of polymorphic loci and the average value of the polymorphic information contents (PIC) of ISSR-PCR markers has appeared much higher in commercial breeds with high effective number in comparison with Ukrainian autochthonous breeds. The population-genetic processes detected by different methods are discussed.

РЕЗЮМЕ. Виконано порівняльний аналіз генетичних структур п'яти порід великої рогатої худоби за поліморфізмом двох різних типів молекулярно-генетичних маркерів — 25 структурним генам та 128 ДНК-локусам (фрагментам ДНК, фланкованим інвертованими повторами микросателітних локусів — ISSR-PCR метод). Незважаючи на наявність породоспецифічних особливостей розподілу генотипів, що виявляли обома методами, рівень середньої гетерозиготності за структурними генами був близький у всіх досліджених порід. Частка поліморфних локусів і усереднене значення поліморфного інформаційного змісту (PIC) ISSR-PCR маркерів виявилось істотно вищим у заводських порід з великою ефективною чисельністю у порівнянні з українськими аутохтонними породами. Обговорюються популяційно-генетичні процеси, які виявляються різними методами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Livshits G., Kobylansky E. Lerner's concept of development homeostasis and the problem of heterozygosity level in natural populations // *Heredity*. — 1985. — 55. — P. 341—353.
2. Leary R.F., Allendorf F.W., Knudsen K.L. Differences in inbreeding coefficients do not explain the association between heterozygosity at allozyme loci and developmental stability in rainbow trout // *Evolution*. — 1987. — 41, № 6. — P. 1413—1415.
3. Алтухов Ю.П. Динамика генофондов при антропогенных воздействиях // *Вестн. ВОГиС*. — 2004. — 8, № 2. — С. 40—59.
4. Dubrova Y.E., Plumb M., Brown J., Jeffreys A.J. Radiation-induced germline instability at minisatellite loci // *Int. J. Radiat. Biol.* — 1998. — 74, № 6. — P. 689—696.

5. *Toth G., Gaspari Z., Jurka J.* Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis // *Gen. Res.* — 2000. — **10**. — P. 417—432.
6. *Gahne B., Juneja R.K., Grolmus J.* Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle // *Anim Blood Groups Biochem Genet.* — 1977. — **8**, № 3. — P. 127—137.
7. *Кириленко С.Д., Глазко В.И.* Идентификация генотипов по каппа-казеину и BLAD-мутации с использованием полимеразной цепной реакции у крупного рогатого скота // *Цитология и генетика.* — 1995. — **29**, № 6. — С. 60—63.
8. *Medrano J.F., Aguilar-Cordova E.* Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis // *Anim. Biotechn.* — 1990. — **1**. — P. 73—77.
9. *Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D.* Genome fingerprinting by sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics.* — 1994. — **20**. — P. 176—183.
10. *Глазко В.И.* ДНК-технологии животных. — К.: Нора-принт, 1997. — 173 с.
11. *Глазко В.И., Дымань Т.Н., Тарасюк С.И., Дубин А.В.* Полиморфизм белков, RAPD-PCR и ISSR-PCR маркеров у зубров, бизонов и крупного рогатого скота // *Цитология и генетика.* — 1999. — **33**, № 6. — С. 30—39.
12. *Kalish J.M., Seidman M.M., Weeks D.L., Glazer P.M.* Triplex-induced recombination and repair in the pyrimidine motif // *Nucl. Acids Res.* — 2005. — **33** (11). — P. 3492—3502.
13. *Botstein D., White R.L., Scolnick M., Davis R.W.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism // *Amer. J. Hum. Genet.* — 1980. — **32**. — P. 314—331.
14. *Williams J.L., Eggen A., Ferretti L. et al.* A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map // *Mammal. Genome.* — 2002. — **13**, № 8. — P. 469—474
15. *Harris H., Hopkinson D.A.* Handbook of enzyme electrophoresis in Human genetics. — Amsterdam : North-Holland Publ. Comp., 1976. — 680 p.

Поступила 29.08.05