



ՀՏԴ 636.32/38.082.12

ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՄՈՒՖԼՈՆԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԱՆՁՆԱԳՐԱՎՈՐՈՒՄԸ ԵՎ ՇՏՐԻՆ-ԿՈՂԱՎՈՐՈՒՄԸ ISSR ՄԱՐԿԵՐՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՄԸ

Մ.Վ. Բադալյան *գ.գ.թ.*, Վ.Թ. Դիլանյան *կ.գ.թ.*, Լ.Ս. Ավագյան *ա.գ.թ.*, Տ.Բ. Ալոյան ^{id}

Հայաստանի ազգային ագրարային համալսարան

badalyan.manvel@mail.ru, varyadilanyan68@gmail.com, avagyan.lusine@bk.ru, tatevaloyan22@gmail.com

ՏԵՂԵԿՈՒԹՅՈՒՆ

Բանալի բառեր՝

գենետիկական բանաձև,
հայկական մուֆլոն,
շտրիխ-կոդ,
պոլիմորֆ սպիտակուցներ,
ISSR մարկեր

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հայկական մուֆլոնի մոլեկուլային-գենետիկական անձնագրավորման և շտրիխ-կոդավորման, միաժամանակ մի շարք պոպուլյացիոն-գենետիկական և ծագումնաբանական հարցերի պարզաբանման նպատակով կիրառվել են ISSR-PCR մարկերներ: 11 ISSR պրայմերներից բարձր ակտիվություն են ունեցել (GA)₉C, (CA)₉G, (CTC)₆G, (GTG)₆C, (ACC)₆G-ը: Հետազոտությունների արդյունքները կարող են կիրառվել հայկական մուֆլոնի նույնականացման, մի շարք օգտակար տնտեսական հատկանիշների լոկուսների քարտեզագրման, ինչպես նաև ճյուղում իրականացվող մոլեկուլային սելեկցիոն աշխատանքներում:

Նախաբան

Բնական էվոլյուցիայի ու մարդու գործունեության արդյունքում ձևավորված գենետիկական ռեսուրսները յուրաքանչյուր երկրի հարստությունն են և բնապահպանական հավասարակշռություն ու սննդի անվտանգությունն ապահովող ռազմավարության տեսանկյունից կատարում են կարևոր դեր:

Հայաստանի տարածքում բնակվում են մի շարք արժեքավոր և էնդեմիկ կենդանատեսակներ, որոնց գենետիկական ներուժն արժեքավոր էլակյութ է գյուղատնտեսական կենդանիների նոր ցեղերի ստեղծման ու առկա բազմազանության բարելավման համար: Առանձնակի ուշադրության է արժանի հայկական մուֆլոնը (*Ovis orientalis gmelinii*), որի մի շարք արժեքավոր կենսաբանական հատկանիշների օգտագործման նպատակով դեռևս անցած հարյուրամյակի կեսերին հիբրիդացման որոշ աշխատանքներ են սկսել կատարել հայ գիտնականները (Khorozyan, et al., 2009):

Տարիների ընթացքում ուսումնասիրվել են հայկական մուֆ-

լոնի, կորիզելի տիպի ոչխարների և դրանց տարբեր սերունդների հիբրիդների միկրոսատելիտային ԴՆԹ-ի լոկուսները, հայկական մուֆլոնի և վերջինիս x ընտանի ոչխարի տրամախաչմամբ ստացված հիբրիդների ալելոտիպերն ու գենոտիպերն ըստ արյան շիճուկի մի շարք պոլիմորֆ սպիտակուցների լոկուսների և այլն (Մ.Վ. Բադալյան և ուրիշ., 2018, Մ.Վ. Բադալյան, Յու.Գ. Մարմարյան, 2019):

Հարկ է նշել, որ գյուղատնտեսական կենդանիների և դրանց վայրի ազգակիցների գենետիկական ներուժի արդյունավետ օգտագործումը, սելեկցիոն գործընթացն առավելագույնս կառավարելի դարձնելը պայմանավորված են տարբեր պոպուլյացիաների գենետիկական կառուցվածքի, առանձին լոկուսների և ալելների հոմոզիգոտության աստիճանի, տնտեսական օգտակար հատկանիշների միջև առկա կապի վերաբերյալ տվյալների իմացությամբ (Alnajm, et al., 2021):

Ներկայումս գյուղատնտեսական արժեքավոր կենդանիների գենետիկական միատարրության խնդիրների լուծման,

գենետիկական երոզիայի կանխման, երկրի տնտեսական աճի բարձրացման և կայուն զարգացման գործում կարևոր դեր են կատարում ոչ միայն գենետիկական նյութի մատչելիությունը, այլև գենետիկական ֆոնդի բազմազանությունը: Այդ տեսանկյունից հատկապես կարևոր է ժամանակակից տեխնոլոգիաների և մեթոդների կիրառմամբ հստակ պատկերացում կազմել կենդանիների տարբեր պոպուլյացիաների գենետիկական կառուցվածքի, այն է՝ ալել-լոֆոտիպի և գենոտիպերի, հոմոզիգոտության աստիճանի, ծագման, գենետիկական նմանության, բանական հատկանիշների լոկուսների (QTL), հիվանդությունների նկատմամբ բնական դիմադրողականության և այլնի վերաբերյալ (Chokheli, et al., 2018, Dossybayev, et al., 2019, Б.О. Бекманов и др., 2015):

Գյուղատնտեսական կենդանիների և մշակաբույսերի գենետիկական բնութագրման նպատակով այժմ լայնորեն կիրառվում է ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) մարկերավորումը կամ միջմիկրոսատելիտային հատվածների անալիզը: ISSR մարկերներն առավել կիրառվում են տարբեր տեսակի գենոֆոնդերն ուսումնասիրելիս: Դրանք օգտագործվում են ինչպես միջտեսակային և ներտեսակային գենետիկական փոփոխականության, պոպուլյացիաների գենետիկական բազմազանության, տեսակների նույնականացման, այնպես էլ գենոմի բարդացման և օգտակար տնտեսական հատկանիշների մարկերավորման աշխատանքներում (Alizadeh, et al., 2017, Bylka, et al., 2014, А.В. Феофилов и др., 2013):

ISSR մարկերավորման համար օգտագործվում են 15-24 նուկլեոտիդային երկարությամբ մեկ կամ մի քանի պրայմերներ՝ կազմված 2-4 կարճ տանդեմային կրկնություններից և պրայմերի 3' ծայրին գտնվող մեկ սելեկտիվ նուկլեոտիդից: Նման պրայմերները հնարավորություն են տալիս ամպլիֆիկացնել միջմիկրոսատելիտում իրար բավականին մոտ տեղակայված ԴՆԹ-ի հատվածներ: ISSR-PCR մարկերներն ունեն ժառանգման դոմինանտ բնույթ (Н.В. Бардуков и др., 2014):

Գենետիկական բազմազանության ուսումնասիրությունների ժամանակ ISSR մարկերները, ի տարբերություն մյուս մարկերների, կարող են գենոմի նուկլեոտիդային հաջորդականություններն ամպլիֆիկացնել նույնիսկ պոլիմերային շղթայական ռեակցիայի (ՊՇՌ) ընթացքում աղտոտման վտանգի առկայության դեպքում: Այս մարկերները չեն պահանջում գենոմի հատվածի վերաբերյալ նախնական տվյալներ, ինչն էլ հնարավորություն է տալիս նույն պրայմերը կիրառել տարբեր օրգանիզմների գենոտիպավորման համար: Բացի այդ՝ դրանք աչքի են ընկնում իրենց արագությամբ, պարզությամբ և արդյունավետությամբ:

Հայկական մուֆլոնի մոլեկուլային-գենետիկական հետազոտության նպատակով ISSR պրայմերների ընտրությունը կատարվել է ըստ դրանց արդյունավետության: Ընտրված բոլոր 11 պրայմերները ՊՇՌ-ի միջոցով առանձին-առանձին փորձարկվել են ուսումնասիրվող տեսակների գենոմային ԴՆԹ-ի հիման վրա:

Հետազոտության նպատակն է ISSR-PCR մարկերների միջոցով բնութագրել հայկական մուֆլոնի գենետիկական բազմազանությունը, վերծանել գենետիկական բանաձևը, կազմել շտրիխ-կոդը և գիտափորձերի արդյունքները կիրառել ճյուղում իրականացվող մոլեկուլային կամ մարկերային սելեկցիոն աշխատանքներում:

Նյութը և մեթոդները

Հայկական մուֆլոնի արյան նմուշառումը կատարվել է Երևանի կենդանաբանական այգում: 3-4 տարեկան 3 արու կենդանիներից արյունը նմուշառվել է հակամակարդիչ պարունակող վակուումային փորձանոթների միջոցով: Մոլեկուլային-գենետիկական հետազոտությունները (А.В. Феофилов и др., 2013) ISSR մեթոդով իրականացվել են ստորև ներկայացված փուլերով:

Գենոմային ԴՆԹ-ի անջատում

Նմուշառված արյունից ԴՆԹ-ն անջատվել է ստանդարտ եղանակով (В.Е. Падугтов и др., 2007): Անջատված ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիան որոշվել է NanoDrop 2000 սպեկտրոֆոտոմետրի միջոցով, այնուհետև ԴՆԹ-ն կոնսերվացվել և պահվել է -20 °C պայմաններում:

ՊՇՌ-ի իրականացում (պրայմերների ընտրություն)

ՊՇՌ-ի համար 10 մկլ ռեակցիոն խառնուրդ ստանալու նպատակով կիրառվել է հետևյալ բաղադրությունը՝ 3,9 մկլ ջուր, 2 մկլ բուֆեր, 1 մկլ dNTP, 0,4 մկլ պրայմեր, 0,1 մկլ Taq-պոլիմերազ, 2 մկլ (40 նգ/մկլ) ԴՆԹ, 0,6 մկլ $MgCl_2$: ՊՇՌ-ն իրականացվել է գերմանական Biometra ֆիրմայի T-personal ամպլիֆիկատորում, հետևյալ ռեժիմով՝ 94 °C-ում ԴՆԹ-ի դենատուրացիա 4 րոպե տևողությամբ, այնուհետև ամպլիֆիկացիայի 35 ցիկլերի դեպքում 94 °C-ում 40 վրկ դենատուրացիա, 52-64 °C-ում 50 վրկ պրայմերների շիկամչակում, 72 °C-ում 40 վրկ էլոնգացիա և 7 րոպե տևողությամբ շղթաների վերջնական էլոնգացիա: ԴՆԹ-ի հատվածների երկարությունը որոշելու նպատակով օգտագործվել է մարկերային ԴՆԹ (100 bp+1.2+1.5+2+3 kb, 13 հատված 100-3000 գ.ն., SolisBrodyne, Estonia):

Էլեկտրաֆորեզ

Ամպլիֆիկացիայի արդյունքները գերմանական Biometria ֆիրմայի Compact S ֆորեզի ապարատի միջոցով էլեկտրաֆորեզի են ենթարկվել 1,7 %-անոց ագարոզային գելի վրա: Վերջինս սկանավորվել է Gel-Doc (Bio-Rad, ԱՄՆ) համակարգի միջոցով: ԴՆԹ-ի հատվածների երկարության որոշման նպատակով Gel-Doc XR համակարգում կիրառվել է Quantity One ծրագիրը:

Գենետիկական բանաձևերի վերծանում և շտրիխ-կոդավորում

Հայկական մուֆլոնի ԴՆԹ-ի շտրիխ-կոդավորման նպատակով կիրառվել է Ս.Վ. Բորոնիկովայի կողմից մշակված տեխնոլոգիան (С.В. Боронникова, 2013):

Ցեղային և տեսակային ԴՆԹ-ի ֆրագմենտները գրառելիս նշվում են տվյալ ցեղի կամ տեսակի անվանման երկու սկզբնատառերը, օրինակ՝ TRr750M27:

Շտրիխ-կոդը կազմվում է ըստ 10-12 շտրիխի, որից 4-ը բնորոշում են ցեղը, 4-6-ը՝ տեսակը, 1-4-ը՝ պոպուլյացիան: Ցեղին բնորոշ ֆրագմենտներն ընդգծվում են հաստ, տեսակին, պոպուլյացիային բնորոշները՝ համապատասխանաբար միջին հաստությամբ, բարակ գծերով: ԴՆԹ-ի ֆրագմենտների դասավորվածությունը շտրիխներում նշվում է ըստ համապատասխան հատվածների երկարության՝ մեծից փոքր հերթականությամբ (С.В. Боронникова, 2009):

Արդյունքները և վերլուծությունը

ԴՆԹ-ի հատվածների թվով պայմանավորված, ըստ համապատասխան՝ 1-5 սանդղակի (1-ը՝ ցածր, 5-ը՝ բարձր), որոշվել է պրայմերների արդյունավետությունը: Ընտրված բոլոր 11 պրայմերներից երկուսի արդյունավետությունը եղել է առավել բարձր (5), երեքինը՝ բարձր (4), մյուս երկուսինը՝ միջին (3), մեկինը՝ ցածր (2), մնացած երեքինը՝ բավականին ցածր (1): Հայկական մուֆլոնի մոլեկուլային-գենետիկական հետազոտությունների համար առանձնացվել է 5 ISSR պրայմեր՝ երկուսը՝ երկնուկլեոտիդային ((GA)₉C,

(CA)₉G), երեքը՝ եռնուկլեոտիդային ((CTC)₆G, (GTG)₆C, (ACC)₆G) (աղ. 1):

Նշված ISSR պրայմերների կիրառմամբ ԴՆԹ-ի ամպլիֆիկացված հատվածները միջինը կազմել են 18, առավելագույնը՝ 22 ((ACC)₆G), նվազագույնը՝ 14 ((CA)₉G) ֆրագմենտ: Ընդհանուր առմամբ հայտնաբերված 88 ISSR ֆրագմենտներից 63-ը կամ 73,6 %-ը եղել են պոլիմորֆ:

Պոպուլյացիաների գենետիկական բազմազանության գնահատման տեսանկյունից կարևոր ցուցանիշ է հազվագյուտ ալելների քանակը (R): Որքան շատ են հազվագյուտ ալելներով գենոտիպերը, այնքան բարձր է տվյալ պոպուլյացիայի յուրահատկության աստիճանը: Փորձնական կենդանիների մոտ գրանցվել է հազվագյուտ ալելներով 2 գենոտիպ կամ 5 %-ից ցածր հաճախականությամբ 2 ֆրագմենտ:

Ներկայումս ԴՆԹ տեխնոլոգիաների զարգացումը հնարավորություն է տալիս գյուղատնտեսական կենդանիների և դրանց վայրի ազգակիցների գենետիկական բազմազանության գնահատման ու անձնագրավորման նպատակով կիրառել ԴՆԹ մարկերների լայն սպեկտր, այդ թվում՝ մոլեկուլային բանաձևերի վերծանում և շտրիխ-կոդավորում (Ю.А. Юлдашбаев и др., 2013):

Աղյուսակ 1. Հայկական մուֆլոնի ԴՆԹ-ի պոլիմորֆիզմը և ISSR պրայմերների արդյունավետությունը*

Պրայմերներ	Ձերմաստիճանը, ց	Պրայմերների արդյունավետությունը	Ամպլիֆիկացված ֆրագմենտների երկարությունը, կ.բ.	ԴՆԹ-ի ֆրագմենտների քանակը, հատ	ԴՆԹ-ի պոլիմորֆ ֆրագմենտների քանակը, հատ	ԴՆԹ-ի պոլիմորֆիզմը, %	ԴՆԹ-ի հազվագյուտ ֆրագմենտների քանակը, հատ
(AG) ₉ C	63	3	200-1500	-	-	-	-
(GA) ₉ C	63	5 [†]	430-1840	18	14	77,8	0
(AC) ₉ G	58	1	350-1050	-	-	-	-
(CA) ₉ G	55	4 [†]	420-730	14	2	64,3	0
(AC) ₉ T	57	1	350-1100	-	-	-	-
(CA) ₉ T	58	2	350-1640	-	-	-	-
(CTC) ₆ G	55	4 [†]	220-650	16	12	75,0	1
(GTG) ₆ C	58	4 [†]	420-1400	18	15	83,3	1
(GAG) ₆ C	56	1	200-1200	-	-	-	-
(ACC) ₆ G	64	5 [†]	400-870	22	13	59,1	0
(AGC) ₆ C	64	3	280-1200	-	-	-	-
Ընդամենը	-	-	-	88	63	71,6	2

Ծանոթություն. 5 - առավել բարձր, 4 - բարձր, 3 - միջին, 2 - ցածր, 1 - բավականին ցածր, † - ընտրված պրայմերներ:

*Կազմվել է հեղինակների կողմից:

- едильбайской породы // Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. - 2015. - N 3. - С. 28-33.
5. Боронникова С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов // Аграрный вестник Урала. - 2009. - N 2. - С. 57-59.
6. Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края. Монография. Пермс. гос. нац. исслед. унт., 2013. - 239 с.
7. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. - Минск: Юнипол, 2007. - 176 с.
8. Феофилов А.В., Юлдашбаев Ю.А., Глазко В.И. Оценка генофонда калмыцкой породы овец, в сравнении с эдильбаевской, с применением ISSR-PCR маркеров // Достижения науки и техники АПК. - 2013. - N 3. - С. 71-73.
9. Юлдашбаев Ю.А., Аббасов М.Р., Лоретц О.Г. Молекулярно-генетический анализ овец разного происхождения // Аграрный вестник Урала. - 2013. - N 6(112). - С. 37-40.
10. Alizadeh, M., Krishna, H., Eftekhari, M., Modareskia, M., Modareskia, M. (2015). Assessment of clonal fidelity in micropropagated horticultural plants. J. Chem. Pharm. Res., 7(12), - pp. 977-990.
11. Alnajm, H., Alijani, S., Javanmard, A., Rafat, S., Hasanpur, K. (2021). Genetic Diversity Analysis of Four Sheep Breeds of Iran: Towards Genetic Maintenance and Conservation Decision. Iranian Journal of Applied Animal Science, 11(3), - pp. 527-538.
12. Bylka, W., Znajdek-Awiżeń, P., Studzińska-Sroka, E., Dańczak-Pazdrowska, A., Brzezińska, M. (2014). Centella asiatica in Dermatology: An Overview. Phytotherapy Research, 28(8), - pp. 1117-1124. <https://doi.org/10.1002/ptr.5110>.
13. Chokheli, V.A., Kagan, D.I., et al. (2018). Ecological and genetic differentiation of populations of Quercus robur L. in the Rostov Region with the use of ISSR-markers. Turczaninowia, 21(4), - pp. 161-167. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.21.4.16>.
14. Dossybayev, K., Orazymbetova, Z., Mussayeva, A., Saitou, N., Zhapbasov, R., Makhatov, B.B.B. (2019). Genetic diversity of different breeds of Kazakh sheep using microsatellite analysis. Arch Anim Breed., 62(1), - pp. 305-312. <https://doi.org/10.5194/aab-62-305-2019>.
15. Khorozyan I., Weinberg P., Malkhasyan A. (2009). Conservation strategy for Armenian mouflon (*Ovis [orientalis] gmelini* Blyth) and bezoar goat (*Capra aegagrus Erxleben*) in Armenia. In Zazanashvili N., Mallon D. (Ed.), Status and Protection of Globally Threatened Species in the Caucasus - pp. 37-45. CEPF, WWF.

Генетическое паспортирование и штрихкодирование армянского муфлона с использованием ISSR-маркеров

М.В. Бадалян, В.Т. Диланян, Л.С. Авагян, Т.Б. Алоян

Национальный аграрный университет Армении

Ключевые слова: армянский муфлон, генетическая формула, полиморфные белки, штрих-код, ISSR-маркер

Аннотация. С целью молекулярно-генетического паспортирования и штрихкодирования армянского муфлона, а также выяснения ряда популяционно-генетических и генеалогических вопросов были использованы маркеры ISSR-PCR. Из 11 праймеров ISSR высокой активностью обладали (GA)₉C, (CA)₉G, (CTC)₆G, (GTG)₆C, (ACC)₆G. Результаты исследований могут быть использованы для идентификации армянского муфлона, картирования локусов ряда хозяйственно ценных признаков, а также для проведения молекулярных селекционных работ в данной линии.

Genetic Passportization and Barcoding of Armenian Mouflon Using ISSR Markers

M.V. Badalyan, V.T. Dilanyan, L.S. Avagyan, T.B. Aloyan

Armenian National Agrarian University

Keywords: *Armenian Mouflon, barcode, genetic formula, ISSR marker, polymorph*

Abstract. In the current period of agricultural management, when the task is to obtain new breeds of farm animals following modern socio-economic, regional, and natural-geographical requirements and to improve the existing ones, the problem of using the rich gene pool of wild relatives very often arises. It should be noted, however, that the genetic potential of the Armenian Mouflon was not used during the creation of agricultural animals, particularly sheep in Armenia. This was due to several biological barriers, which are currently surmountable with the use of modern biotechnological methods, especially genomic selection. To resolve the issue, we carried out the genetic passportization and barcoding of the Armenian Mouflon kept in the Yerevan Zoo according to ISSR-PCR markers. Five of the 11 ISSR primers used during molecular-genetic research had high activity: (GA)₉C, (CA)₉G, (CTC)₆G, (GTG)₆C, and (ACC)₆G. A total of 63 or 71.6 % of the 88 ISSR-PCR amplicons were polymorphic. The lowest value of polymorphic DNA fragments was recorded for (ACC)₆G (59.1 %) and the highest for (GTG)₆C (83.3%) primers. The number of rare alleles, which indicates the originality and homogeneity of the given population, in the experimental group were: (CTC)₆G and (GTG)₆C. From the analysis of the material obtained during the experimental research, it was possible to decode the genetic formula and barcode of the Armenian Mouflon, which can be used as a test to clarify the identification, origin, and evolution of the species and conduct molecular selection in the breeding processes.

Շահերի հայտարարագիր

Ֆեդինսկները հայտարարում են, որ այս հոդվածի հետազոտության, հեղինակության և/կամ հրապարակման հետ կապված շահերի բախում առկա չէ:

Ընդունվել է՝ 06.10.2023 թ.
Գրախոսվել է՝ 23.01.2024 թ.