

Молекулярная генетика

Рубрика

doi: 10.31043/2410-2733-2018-3-3-10

УДК 636.32/.38

Т. Е. Денискова, О. В. Костюнина, В. В. Волкова, Н. А. Зиновьева

Применение микросателлитных маркеров для идентификации представителей рода *Ovis*

Аннотация. Установление видовой принадлежности представителей дикой фауны в пределах одного рода имеет важное значение как для популяционной генетики, выявления гибридов в зонах контакта, так и для криминалистической экспертизы и внесения вклада в создание программ по консервации генетических ресурсов. Наиболее информативным методом исследований диких видов является кросс-видовая амплификация панелей ДНК-маркеров, разработанных для домашних сородичей. В связи с этим целью нашей работы стало изучение идентификации видов рода *Ovis* на основании данных микросателлитных маркеров домашней овцы. Исследование было проведено на трех группах архаров ($n=7$, $n=6$, $n=16$), муфлонах ($n=22$); снежных баранах, в том числе из якутского подвида, отобранных в нескольких хребтах ($n=17$, $n=11$, $n=21$, $n=10$), и чукотского подвида ($n=3$); домашних овец ($n=35$). При анализе генетической сети NeighborNet было выявлено, что снежные бараны формируют собственный удаленный кластер ($DN=$ от 1,544 до 2,225; от 1,685 до 2,424; 1,674 до 2,454 между группами снежного барана и муфлонами; овцами и архарами, соответственно). При этом остальные изучаемые виды формируют два кластера: первый включает группы архаров, а второй — муфлонов и овец. PCoA-анализ показал, что первая координата четко отделяла снежных баранов от остальных групп ($Fst = 0,304$; $0,333$; $0,378$ между снежными баранами и овцой, архарами, муфлонами, соответственно). Вторая главная координата отсоединяла чукотских от якутских толсторогов и группы архаров от овцы и муфлона. Для установления индивидуальной принадлежности к группе был проведен кластерный анализ в программе STRUCTURE. При $K=2$ муфлоны образуют единый кластер с домашними овцами, а снежные бараны — с архарами. При $K=3$ снежные бараны и архары формируют собственные кластеры. При $K=5$ каждый изучаемый вид формирует собственный кластер, при этом средние значения критерия членства для домашних овец, муфлонов и снежных баранов были высокими и составили $Q3/5=0,976\pm0,004$, $Q2/5=0,980\pm0,004$ и $Q5/5=0,962\pm0,011$, соответственно. Для группы архаров критерий членства был ниже ($Q1/5=0,747\pm0,072$). При $K=6$ чукотские толстороги ($Q4/6=0,991\pm0,001$) четко отделяются от своих якутских сородичей ($Q6/6=0,947\pm0,014$). Таким образом, нами было продемонстрировано, что решающей способности десяти микросателлитных маркеров домашних овец достаточно для идентификации диких представителей рода *Ovis*.

Ключевые слова: род *Ovis*, домашняя овца, дикие сородичи, архары, снежные бараны, муфлоны, микросателлитные локусы, идентификация.

Авторы:

Денискова Т. Е. — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: horarka@yandex.ru;

Костюнина О. В. — доктор биологических наук, руководитель лаборатории, e-mail: kostolan@yandex.ru;

Волкова В. В. — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: moonlit_elf@mail.ru;

Зиновьева Н. А. — доктор биологических наук, академик РАН, e-mail: n_zinovieva@mail.ru.

Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, 142132, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

Введение. Использование молекулярных маркеров для идентификации диких видов представляет собой важный аспект их сохранения, прояснения таксономических неопределенностей и выявления внутривидовых группировок, а также имеет прикладную значимость для криминалистической экспертизы. Кроме того, анализ результатов, получен-

ных с помощью ДНК-маркеров, может быть полезным для предотвращения браконьерства и для более эффективного осуществления законов о защите исчезающих видов [1, 2].

Тем не менее, генетические исследования диких животных по сравнению с сельскохозяйственными видами часто бывают ограничены рядом

факторов. Представителей дикой фауны можно подразделить на так называемые немодельные виды, чей геном до сих пор еще полностью не расшифрован (например, *Ovis nivicola*, *Rangifer tarandus*), и виды, нуклеотидная последовательность генома которых уже известна. Однако создание специальных панелей маркеров для обеих вышеперечисленных групп является высокостратным как по трудоемкости, так и по стоимости разработки.

Многие научные коллективы для решения данной проблемы применяют анализ полиморфизма митохондриальной ДНК(мтДНК) [3, 4] и «анонимные» или доминантные маркеры, такие как ISSR и RAPD [5]. Митохондриальный геном млекопитающих, как правило, состоит из 16–17 тыс. пар нуклеотидов, что позволяет провести его секвенирование с наименьшими затратами. Тем не менее, данный подход позволяет оценить наследственность только по материнской линии, что не всегда является информативным при работе с животными, обитающими в гибридных зонах, а также создает определенные проблемы в криминалистике [6].

Среди маркеров с «анонимной» последовательностью ISSR-маркеры являются наиболее часто используемыми. Преимуществами данного метода являются, прежде всего, их низкая себестоимость, их универсальность, низкая трудоемкость. Но, несмотря на довольно большую популярность ISSR-маркеров [7, 8, 9], имеется ряд недостатков. Во-первых, из-за «анонимной» последовательности возможны ошибки отжига праймеров; во-вторых, как воспроизводимость и повторяемость результатов, так и учет отжигаемых фрагментов являются «слабым» местом методики [10]; в-третьих, полученные результаты сложно использовать в практике.

У многих диких видов имеется более или менее удаленный одомашнированный сородич. В этой связи наиболее эффективным подходом является кросс-видовая амплификация ядерных маркеров (микросателлитов и ДНК-чипов на основе множественных SNPs), созданных для домашних видов. Несмотря на то, что была показана высокая эффективность применения ДНК-чипов для изучения генетической дифференциации и биоразнообразия диких видов [11, 12, 13, 14], в силу своей доступности, низкой себестоимости и высокой информативности именно микросателлиты стали основным типом ДНК-маркеров, применяемых для решения проблем популяционной генетики, в том числе для криминалистической экспертизы и создания программ консервации и рационального использования генетических ресурсов, находящихся в зоне риска [15, 16, 17].

В ДНК банке ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста собрана уникальная коллекция образцов животных из рода *Ovis*, включающая архаров (*O. ammon*), муфлонов (*O. orientalis*) и представителей якутского и чукотского подвидов снежного барана (*O. nivicola*). Кросс-амплификация микросателлитных маркеров домашних овец для диких сородичей была показана ранее [4, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. Однако изучение возможности генетической дифференциации животных диких видов между собой и домашней овцой по микросателлитам не проводилось.

Цель и методика исследований. Целью нашей работы стало изучение возможности идентификации видов рода *Ovis* на основании результатов, полученных с помощью микросателлитных маркеров домашних овец.

Выборка для настоящей работы включала следующих представителей рода *Ovis*: архары *O. ammon*, отобранные в трех точках: ARGALI KYR (n=7), Киргизия, ARGALI KYR-CH (n=6), на границе Киргизии и Китая, ARGALI TAD (n=16), Таджикистан; муфлоны *O. musimon* (MOUFLON, n=22); снежные бараны *O. nivicola*, в том числе особи из якутского подвида, отобранные в нескольких хребтах (SN-ORU, n=17, SN-TIK, n=11, SN-VER, n=21, SN-SKH, n=10) и чукотского подвида (SN-CH, n=3); домашние овцы *O. aries* (SHEEP, n=35).

Работа была выполнена на базе лаборатории молекулярных основ селекции отдела биотехнологии и молекулярной диагностики животных ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста в 2016–2018 гг. Выделение ДНК производили набором «ДНК-Экстран» (ЗАО «Синтол», Россия). Одинадцать микросателлитных локусов, рекомендованных Международным обществом по генетике животных (ISAG) и предназначенных для домашних овец (*O. aries*), были выбраны для кросс-амплификации и объединены в две мультиплексные панели. Изучение полиморфизма отобранных маркеров производили на генетическом анализаторе ABI3130xl («Applied Biosystems», США).

Матрица генетических несмещенных дистанций по М. Нею (D_N) [24] была рассчитана в программе GenAIEx 6.503 [25] и визуализирована в виде NeighborNet в программе SplitsTree 4.14.5 [26]. Анализ главных координат (PCoA) на основании попарных значений F_{st} проводился в программе GenAIEx 6.503. Кластерный анализ без предварительного указания принадлежности к группе был проведен в программе Structure 2.3.4 [27].

Результаты исследований. На графике NeighborNet (Рис.1) все группы снежного барана

сформировали ветви на противоположной стороне сети от остальных групп, образуя тем самым условный кластер. И действительно, значения D_N между группами снежного барана и другими изучаемыми видами были существенными: от 1,544 до 2,225 с муфлонами; от 1,685 до 2,424 с домашней овцой; от 1,674 до 2,454 с архарами, соответственно. Внутри кластера снежных баранов наблюдается четкое обособление толсторогов чукотского подвида от якутских сородичей (D_N от 0,538 между SN-CH и SN-VER до 0,681 между SN-CH и SN-TIK). Оставшиеся группы, в свою очередь, мож-

но условно подразделить на два кластера, первый из которых включал отдельные ветви муфлонов и домашних овец ($D_N=0,788$), а второй был представлен тремя территориальными популяциями архаров.

Аналогичный характер филогенетических связей между изучаемыми группами был установлен на основании результатов РСoA-анализа (Рис. 2). Первая главная координата четко отделяла снежных баранов от остальных групп, что соответствует числовым значениям F_{st} 0,304; 0,333; 0,378 между толсторогами и овцой, архарами, муфлонами, соответственно.

Вторая главная координата соединяла чукотских от якутских толсторогов и группы архаров от овцы и муфлона, соответственно. Максимальные значения F_{st} между муфлонами и архарами; муфлонами и домашними овцами; архарами и домашними овцами составили 0,233; 0,169 и 0,196, соответственно.

Если рассматривать генетические взаимосвязи внутри подвидов, то согласно классификации D. L. Hartl и A. G. Clark [28] пары географических популяций SN-ORU и SN-VER ($F_{st}=0,034$); SN-TIK и SN-ORU ($F_{st}=0,042$); SN-VER и SN-SKH ($F_{st}=0,041$); ARGALI TAD и ARGALI KYR ($F_{st}=0,043$) характеризуются незначительной дифференциацией, в то время как SN-VER и SN-TIK ($F_{st}=0,060$); SN-SKH и SN-ORU ($F_{st}=0,058$); SN-SKH и SN-TIK ($F_{st}=0,079$); ARGALI KYR-CH и ARGALI KYR ($F_{st}=0,108$); ARGALI KYR-CH и ARGALI TAD ($F_{st}=0,090$) — умеренной.

Для установления принадлежности особи к своей группе мы провели кластерный анализ в программе STRUCTURE с выбором наиболее вероятного числа популяций (K) от 2 до 12 (Рис. 3). При $K=2$ муфлоны образуют единый кластер с домашними овцами ($Q_{1/2}=0,994\pm0,002$), а снежные бараны — с архарами ($Q_{2/2}=0,951\pm0,018$), соответственно. При $K=3$ снежные бараны ($Q_{3/3}=0,984\pm0,004$) и архары ($Q_{1/3}=0,942\pm0,025$) формируют собственные кластеры.

Отделение муфлонов и домашних овец происходит при $K=5$, то

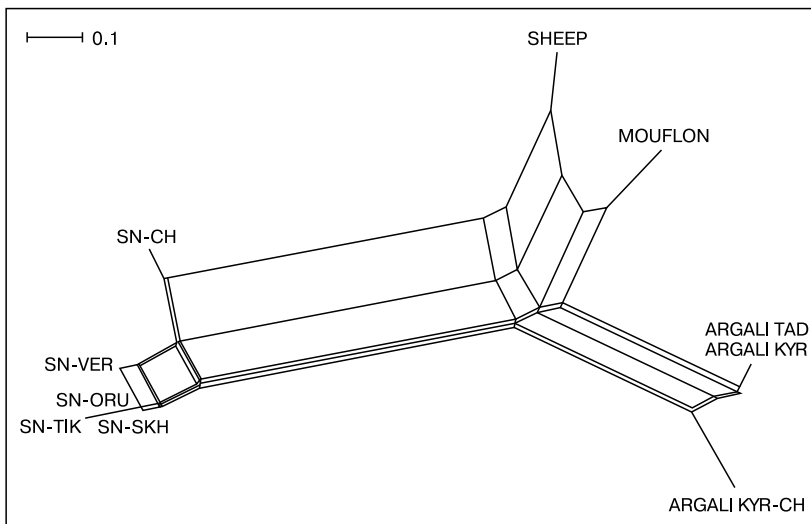


Рис. 1. Генетическая сеть, иллюстрирующая взаимосвязи изучаемых групп рода *Ovis* на основе матрицы несмещенных генетических расстояний Нея [24]. Аббревиатура групп приведена в разделе «Цель и методика исследований»

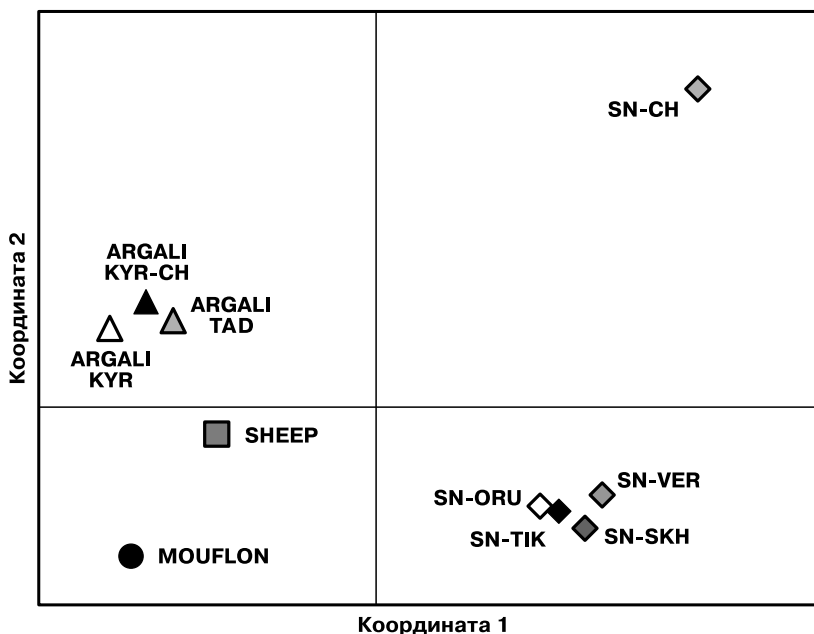


Рис. 2. Генетическая дифференциация изучаемых групп в пространстве первых двух главных координат, рассчитанных по показателю F_{st} , на основании РСoA-анализа при парном сравнении. Аббревиатура групп приведена в разделе «Цель и методика исследований»

Таблица 1. Значения показателя F_{st} и генетических дистанций Нея для изучаемых групп рода *Ovis*

Группа		ARGALI			MO- UFLON	SNOW SHEEP					SHEEP
		KYR	KYR-CH	TAD		CH	ORU	VER	TIK	SKH	
ARGALI	KYR	0,000	0,396	0,098	0,989	2,203	1,795	1,990	1,826	1,917	1,475
	KYR-CH	0,108	0,000	0,446	1,593	2,153	1,674	2,029	2,454	1,895	1,681
	TAD	0,043	0,090	0,000	1,253	1,828	1,845	2,370	1,830	1,962	1,450
MOUFLON		0,182	0,233	0,170	0,000	2,225	1,880	1,761	2,050	1,544	0,788
SNOW SHEEP	CH	0,327	0,333	0,269	0,378	0,000	0,616	0,538	0,681	0,563	1,587
	ORU	0,177	0,178	0,140	0,218	0,204	0,000	0,074	0,097	0,158	2,040
	VER	0,203	0,210	0,169	0,238	0,179	0,034	0,000	0,194	0,089	1,685
	TIK	0,194	0,211	0,155	0,242	0,217	0,042	0,060	0,000	0,240	2,424
	SKH	0,216	0,218	0,175	0,238	0,214	0,058	0,041	0,079	0,000	1,853
SHEEP		0,177	0,196	0,143	0,169	0,304	0,181	0,194	0,204	0,209	0,000

Примечание: Значения показателя F_{st} приведены под диагональю, несмещенные генетические дистанции Нея показаны над диагональю. Аббревиатура групп приведена в разделе «Цель и методика исследований»

есть наблюдается такой генетический паттерн, при котором представителям каждого вида соответствует своя группа. Средние значения критерия Q , или критерия членства особи в своем кластере,

были высокими для домашних овец, муфлонов и снежных баранов и составили $Q_{3/5}=0,976\pm0,004$, $Q_{2/5}=0,980\pm0,004$ и $Q_{5/5}=0,962\pm0,011$, соответственно. Для группы архаров критерий членства

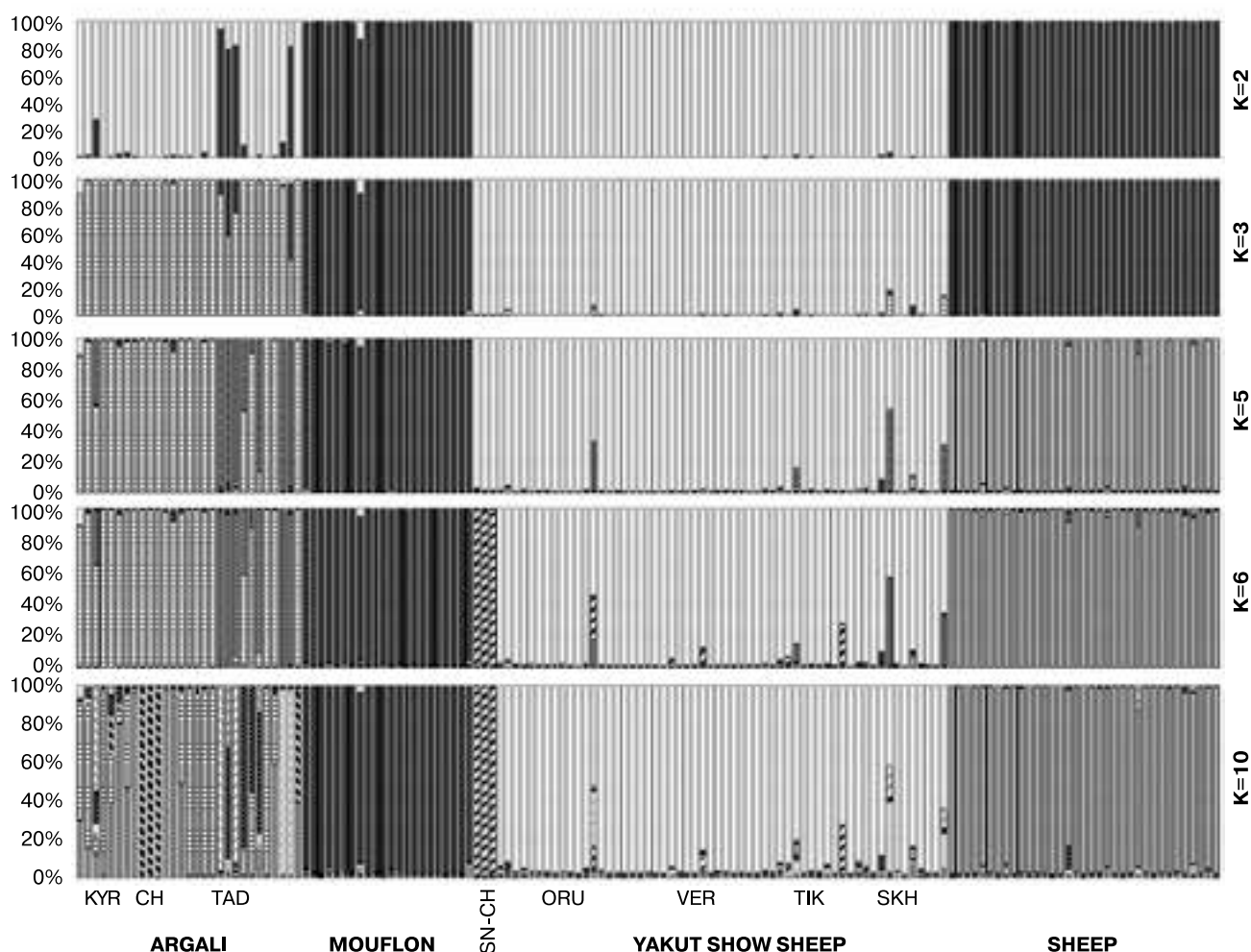


Рис. 3. Кластерный анализ принадлежности к своей группе в программе STRUCTURE. Аббревиатура групп приведена в разделе «Цель и методика исследований»

был ниже ($Q_{1/5}=0,747\pm0,072$). При разделении общей выборки архаров на территориальные подгруппы критерии членства составили $Q_{1/5}=0,903\pm0,059$ для ARGALI KYR, $Q_{1/5}=0,973\pm0,012$ для ARGALI KYR-CH и $Q_{1/5}=0,594\pm0,117$ для ARGALI TAD.

При $K=6$ чукотские толстороги ($Q_{4/6}=0,991\pm0,001$) четко отделяются от своих якутских сородичей ($Q_{6/6}=0,947\pm0,014$), что обусловлено их принадлежностью к разным подвидам.

При $K=10$ заметно, что по сравнению со всеми изучаемыми группами архары характеризуются наиболее неоднородной генетической структурой с заметной долей адмиксии, генетический источник которой отсутствует в нашей работе. Так, средние значения критерия членства составили $Q_{2/10}=0,495\pm0,218$, $Q_{2/10}=0,458\pm0,129$ и $Q_{2/10}=0,398\pm0,106$ для ARGALI KYR-CH, ARGALI KYR и ARGALI TAD, соответственно.

Якутские толстороги даже при $K=10$ представляют консолидированный кластер без подразделения на географические группы, что полностью согласуется с результатами нашего предыдущего исследования [29].

Выводы. Рекомендации. В результате нашей работы был получен паттерн генетических взаимосвязей изучаемых видов из рода *Ovis*, который

согласуется с принятой систематикой и филогенией данных видов. Так, согласно данным митохондриального анализа [3], снежные бараны отделились от остальных групп примерно 2,42 млн лет назад, в то время как дивергенция архаров и муфлонов произошла значительно позднее — около 1,72 млн лет назад. Муфлон считается наиболее вероятным предком домашней овцы [30], что объясняет более тесные генетические связи, продемонстрированные в настоящем исследовании, между представителями данного вида и домашними овцами, чем с другими группами.

Таким образом, нами было продемонстрировано, что одиннадцати микросателлитных маркеров, предназначенных для домашних овец, достаточно для идентификации диких представителей рода *Ovis*, что позволяет широко использовать данный метод в популяционно-генетических исследованиях этих видов. Тем не менее, емкости микросателлитных маркеров недостаточно для оценки популяционной структуры территориальных групп внутри одного подвида снежных баранов. В дальнейшем планируется расширение выборки как по численности, так и по количеству вовлечённых диких видов для оценки генетического разнообразия и характеристики аллелофонда диких сородичей домашней овцы.

Благодарим Домского И. А. и Алискерова С. В. за предоставленные образцы ткани архаров и муфлонов. При выполнении исследований было использовано оборудование Центра коллективного пользования научным оборудованием «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста. Образцы ткани снежного барана были получены в рамках выполнения НИР по гранту РНФ № 14-36-00039.

Исследования были проведены в рамках выполнения задания Федерального агентства научных организаций (ФАНО) № АААА-А18-118021590138-1 в 2018 году.

Литература

1. Arif I. A. DNA marker technology for wildlife conservation / I. A. Arif, H. A. Khan, A. H. Bahkali, A. A. Al Homaidan, A. H. Al Farhan, M. Al Sadoon, M. Shobrak // Saudi Journal of Biological Sciences. — 2011. — № 18. — P. 219–225.
2. Ogden R. Wildlife DNA forensics—bridging the gap between conservation genetics and law enforcement / R. Ogden, N. Dawnay, R. McEwing // E. Species Res. — 2009. — № 9. — P. 179–195.
3. Rezaei H. R. Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae) / H. R. Rezaei, S. Naderia, I. C. Chintauan-Marquiera, S. Jordan, P. Taberlet, A. T. Virk, H. R. Naghash, D. Rioux, M. Kaboli, G. Luikart, F. Pompanon // Molecular Phylogenetics and Evolution. — 2010. — № 54. — P. 315–326.
4. Feng J. Genetic differentiation of argali sheep *Ovis ammon* in Mongolia revealed by mitochondrial control region and nuclear microsatellites analyses / J. Feng, M. R. Frisina, M. S. Webster, G. Ulziimaa // Journal of the Bombay Natural History Society. — 2009. — № 106 (1). — P. 38–44.
5. Fahmi A. I. Genetic Variation in Captive Herd of Arabian Oryx Using RAPD and ISSR Markers / Fahmi A. I., Al-Otaibi S. A. // African Journal of Biotechnology. — 2011. — № 10 (27). — P. 5251–5262.
6. Budowle B. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations / B. Budowle, M. W. Al-lard, M. R. Wilson, R. Chakraborty // Annu Rev Genomics Hum Genet. — 2003. — № 4 — P. 119–141.
7. Kol N. V. Polymorphism of ISSR-PCR markers in Tuvian population of Reindeer *Rangifer tarandus* / N. V. Kol, O. E. Lazebny // Russ. J. Genet. — 2006. — № 42. — P. 1466–1469.

8. Столповский Ю. А. Сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров в популяциях яка (*Bos mutus*) и гибридов F1 между яком и крупным рогатым скотом в Саяно-Алтайском регионе / Ю. А. Столповский, Н. В. Кол, А. Н. Евсюков, Л. В. Нестерук, Ч. М. Доржу, Ц. Цендсурэн, Г. Е. Сулимова // Генетика. — 2014. — № 50 (10). — С. 1163.
9. Gaponova I. I. Comparative analysis of polylocus spectra of ISSR-PCR markers in dogs, jackals and wolves / I. I. Gaponova, V. I. Glazko, T. V. Blokhina, E. A. Knyaseva, T. T. Glazko // Central European Journal of Zoology. — 2017. — V. 1. № 3. — P. 4–18.
10. Serra I. A. Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in the seagrass *Posidonia oceanica* / I. A. Serra, G. Procaccini, M. C. Intrieri, M. Migliaccio, S. Mazzuca, A. M. Innocenti // Marine Ecology Progress Series. — 2007. — № 8. — P. 71–79.
11. Miller J. M. A genome-wide set of SNPs detects population substructure and long-range linkage disequilibrium in wild sheep / J. M. Miller, J. Poissant, J. W. Kijas, D. W. Coltman, the International Sheep Genomics Consortium // Molecular Ecology Resources. — 2011. — № 11 (2). — P. 314–322.
12. Garvin M. R. Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review / M. R. Garvin, K. Saitoh, A. J. Gharrett // Molecular Ecology Resources. — 2010. — № 10. — P. 915–934.
13. Ogden R. The use of cross-species genome-wide arrays to discover SNP markers for conservation genetics: a case study from Arabian and scimitar-horned oryx / R. Ogden, J. Baird, H. Senn, R. McEwing // Conservation Genetics Resources. — 2012. — № 4. — P. 471–473.
14. Kharzinova V. R. A study of applicability of SNP chips developed for bovine and ovine species to whole-genome analysis of reindeer *Rangifer tarandus* / V. R. Kharzinova, A. A. Sermyagin, E. A. Gladyr, G. Brem, N. A. Zinovieva, I. M. Okhlopov // Journal of Heredity. — 2015. — № 106 (6). — P. 758–761.
15. Kim K.-S. Cross-Species Amplification of Bovidae Microsatellites and Low Diversity of the Endangered Korean Goral / K.-S. Kim, M.-S. Min, J.-H. An, H. Lee // Journal of Heredity. — 2004. — № 95 (6). — P. 521–525.
16. Marín J. C. Cross-amplification of nonspecific microsatellites markers: a useful tool to study endangered/vulnerable species of southern Andes deer / J. C. Marín, P. Orozco-ter Wengel, K. Romero, J. P. Vásquez, V. Varas, J. A. Vianna // Genet Mol. Res. — 2014. — № 13 (2). — P. 3193–3200.
17. Nguyen T. T. Genomic conservation of cattle microsatellite loci in wild gaur (*Bos gaurus*) and current genetic status of this species in Vietnam / T. T. Nguyen, S. Genini, L. C. Bui, P. Voegeli, G. Stranzinger, J. P. Renard, J. C. Maillard, B. X. Nguyen // BMC Genet. — 2007. — № 6. — P. 77.
18. Gutierrez E. Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implications for conservation / E. Gutierrez, S. Kalinowski, W. Boyce, P. Hedrick // Conservation Genetics. — 2000. — № 1 (1). — P. 3–15.
19. Poissant J. Genome-wide cross-amplification of domestic sheep microsatellites in bighorn sheep and mountain goats / J. Poissant, A. B. Shafer, C. S. Davis, J. Mainguy, J. T. Hogg, S. D. Côté, D. W. Coltman // Mol Ecol Resour. — 2009. — № 9 (4). — P. 1121–1126.
20. Abad-Zavaleta J. Genetic diversity analysis of two desert bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*) population in Mexico / J. Abad-Zavaleta, A. M. Sifuentes-Rincon, A. Lafon-Terrazas, J. Gutierrez-Alderete, E. Gonzalez-Rodriguez, J. A. Ortega-Gutierrez, S. Del Moral, C. A. Meza-Herrera // Tropical and Subtropical Agroecosystems. — 2011. — № 14. — P. 171–178.
21. Worley K. Population genetic structure of North American thin horn sheep (*Ovis dalli*) / K. Worley, C. Strobeck, S. Arthur, J. Carey, H. Schwantje, A. Veitch, D. W. Coltman // Molecular Ecology. — 2004. — № 13 (9). — P. 2545–2556.
22. Petit E. Genetic structure of populations of the Mediterranean mouflon (*Ovis gmelini*) / E. Petit, S. Aulagnier, R. Bon, M. Dubois, B. Crouau-Roy // Journal of Mammalogy. — 1997. — № 78 (2). — P. 459–467.
23. Sadeghi B. Genetic Diversity of Tandureh Mouflon Population / B. Sadeghi // Acta Vet Eurasia. — 2018. — № 44. — P. 20–25.
24. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics, Columbia University Press, New York, 1987
25. Peakall R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update / R. Peakall, P. E. Smouse // Bioinformatics. — 2012. — № 28. — P. 2537–2539
26. Huson D. H. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies / D. H. Huson, D. Bryant // Molecular Biology and Evolution. — 2006. — № 23 (2). — P. 254–267.
27. Prichard J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Prichard, M. Stephens, P. Donnelly // Genetics. — 2000. — № 155. — P. 945–959.
28. Hartl D. L., Clark A. G. Principles of population genetics, United Kingdom: Sunderland, 1997.
29. Денискова Т. Е. Сравнительное исследование информативности STR и SNP маркеров для внутривидовой и межвидовой дифференциации рода *Ovis* / Т. Е. Денискова, Сермягин А.А., В. А. Багиров, И. М. Охлопков, Е. А. Гладырь, Р. В. Иванов, Г. Брем, Н. А. Зиновьева // Генетика. — 2016. — № 52 (1). — С. 90–96.
30. Vigne J. D. The origins of animal domestication and husbandry: a major change in the history of humanity and the biosphere / J. D. Vigne // C R Biol. — 2011. — № 334 (3). — P. 171–181.

Deniskova T., Kostyunina O., Volkova V., Zinovieva N.

The identification of representatives of the genus *Ovis* by microsatellite markers

Abstract. *The identification of wildlife species belonging to the same genus is important for population genetics, for detection of hybrids in contact zones, as well as for forensics and for monitoring to create the conservation programs for genetic recourses. The most informative method in wildlife species is the cross-species amplification of DNA marker panels designed for domestic relatives. In this regard, the purpose of our work was to perform the identification of species of the genus Ovis based on microsatellite markers of the domestic sheep. The materials for our research included three groups of argali (n=7, n=6, n=16), mouflon (n=22); snow sheep, including the Yakut subspecies from several ranges (n=17, n=11, n=21, n=10), and the Chukchi subspecies (n=3); domestic sheep (n=35). Analysis of the NeighborNet revealed that snow sheep formed own remote cluster (DN=1.544 to 2.225, 1.685 to 2.424, 1.674 to 2.454 between snow sheep and mouflon domestic sheep and argali, respectively). The remaining species under the study formed two clusters: the first included groups of argali, and the second comprised of mouflons and domestic sheep. PCoA showed that the first principal coordinate clearly divided snow sheep from the remaining groups (Fst=0.304, 0.333, 0.378 between snow sheep and domestic sheep, argali, mouflon, respectively). The second principal coordinate separated the Chukchi from the Yakut bighorns and groups of argali from domestic sheep and mouflon, respectively. To determine the individual belonging to the group, a cluster analysis was carried out in the STRUCTURE program. At K=2, mouflons formed a shared cluster with domestic sheep, while snow sheep and argali included in the other cluster. At K=3, snow sheep and argali formed own clusters. At K=5, each specie had own cluster. The average membership criterions were $Q_3 / 5 = 0.976 \pm 0.004$ for domestic sheep, $Q_2 / 5 = 0.980 \pm 0.004$ for mouflons and $Q_5 / 5 = 0.962 \pm 0.011$ for snow sheep. Regarding the argali group, its membership criterion was lower ($Q_1 / 5 = 0.747 \pm 0.072$). At K=6, the Chukchi bighorns ($Q_4 / 6 = 0.991 \pm 0.001$) clearly separate from their Yakut relatives ($Q_6 / 6 = 0.947 \pm 0.014$). Thus, we demonstrated that the resolving power of ten microsatellite markers of domestic sheep is sufficient to identify wild representatives of the genus Ovis.*

Key words: *Ovis* genus, domestic sheep, wild relatives, argali, snow sheep, mouflons, microsatellite loci, identification.

Authors:

Deniskova T. — PhD (Biol. Sci.), senior researcher, e-mail: horarka@yandex.ru;

Kostyunina O. — Dr. Habil (Biol. Sci.), head of laboratory, e-mail: kostolan@yandex.ru;

Volkova V. — PhD (Biol. Sci.), senior researcher, e-mail: moonlit_elf@mail.ru;

Zinovieva N. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), Academician of RAS, Director, e-mail: n_zinovieva@mail.ru.

Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, 142132, Moscow region, Podolsk city district, Dubrovitsy settlement, 60.

References

1. Arif I. A. DNA marker technology for wildlife conservation. / I. A. Arif, H. A. Khan, A. H. Bahkali, A. A. Al Homaidan, A. H. Al Farhan, M. Al Sadoon, M. Shobrak // Saudi Journal of Biological Sciences. — 2011. — № 18. — P. 219–225.
2. Ogden R. Wildlife DNA forensics—bridging the gap between conservation genetics and law enforcement / R. Ogden, N. Dawnay, R. McEwing // E. Species Res. — 2009. — № 9. — P. 179–195.
3. Rezaei H. R. Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae) / H. R. Rezaei, S. Naderia, I. C. Chintauan-Marquiera, S. Jordan, P. Taberlet, A. T. Virk, H. R. Naghash, D. Rioux, M. Kaboli, G. Luikart, F. Pompanon // Molecular Phylogenetics and Evolution. — 2010. — № 54. — P. 315–326.
4. Feng J. Genetic differentiation of argali sheep *Ovis ammon* in Mongolia revealed by mitochondrial control region and nuclear microsatellites analyses / J. Feng, M. R. Frisina, M. S. Webster, G. Ulziimaa // Journal of the Bombay Natural History Society. — 2009. — № 106 (1). — P. 38–44.
5. Fahmi A. I. Genetic Variation in Captive Herd of Arabian Oryx Using RAPD and ISSR Markers / Fahmi A.I., Al-Otaibi S.A. // African Journal of Biotechnology. — 2011. — № 10 (27). — P. 5251–5262.
6. Budowle B. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations / B. Budowle, M. W. Allard, M. R. Wilson, R. Chakraborty // Annu Rev Genomics Hum Genet. — 2003. — № 4. — P. 119–141.

7. Kol N. V. Polymorphism of ISSR-PCR markers in Tuvian population of Reindeer *Rangifer tarandus* / N. V. Kol, O. E. Lazebny // Russ. J. Genet. — 2006. — № 42. — P. 1466–1469.
8. Stolpovsky Y. A. Comparative analysis of ISSR marker polymorphism in populations of yak (*Bos mutus*) and in F1 hybrids between yak and cattle in the Sayan-Altai region / Y. A. Stolpovsky, N. V. Kol, A. N. Evsyukov, L. V. Nesteruk, G. E. Sulimova, C. M. Dorzhu, T. Tsendsuren // Russian Journal of Genetics. — 2014. — № 50 (10). — P. 1025–1037.
9. Gaponova I. I. Comparative analysis of polylocus spectra of ISSR-PCR markers in dogs, jackals and wolves / I. I. Gaponova, V. I. Glazko, T. V. Blokhina, E. A. Knyaseva, T. T. Glazko // Central European Journal of Zoology. — 2017. — V. 1. № 3. — P. 4–18.
10. Serra I. A. Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in the seagrass *Posidonia oceanica*. / I. A. Serra, G. Procaccini, M. C. Intrieri, M. Migliaccio, S. Mazzuca, A. M. Innocenti // Marine Ecology Progress Series. — 2007. — № 8. — P. 71–79.
11. Miller J. M. A genome-wide set of SNPs detects population substructure and long-range linkage disequilibrium in wild sheep / J. M. Miller, J. Poissant, J. W. Kijas, D. W. Coltman, the International Sheep Genomics Consortium // Molecular Ecology Resources. — 2011. — № 11(2). — P. 314–322.
12. Garvin M. R. Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review / M. R. Garvin, K. Saitoh, A. J. Gharrett // Molecular Ecology Resources. — 2010. — № 10. — P. 915–934.
13. Ogden R. The use of cross-species genome-wide arrays to discover SNP markers for conservation genetics: a case study from Arabian and scimitar-horned oryx / R. Ogden, J. Baird, H. Senn, R. McEwing // Conservation Genetics Resources. — 2012. — № 4. — P. 471–473.
14. Kharzinova V. R. A study of applicability of SNP chips developed for bovine and ovine species to whole-genome analysis of reindeer *Rangifer Tarandus* / V. R. Kharzinova, A. A. Sermyagin, E. A. Gladyr, G. Brem, N. A. Zinovieva, I. M. Okhlopov // Journal of Heredity. — 2015. — № 106(6). — P. 758–761.
15. Kim K.-S. Cross-Species Amplification of Bovidae Microsatellites and Low Diversity of the Endangered Korean Goral / K.-S. Kim, M.-S. Min, J.-H. An, H. Lee // Journal of Heredity. — 2004. — № 95 (6). — P. 521–525.
16. Marín J. C. Cross-amplification of nonspecific microsatellites markers: a useful tool to study endangered / vulnerable species of southern Andes deer / J. C. Marín, P. Orozco-terWengel, K. Romero, J. P. Vásquez, V. Varas, J. A. Vianna // Genet Mol. Res. — 2014. — № 13 (2). — P. 3193–3200.
17. Nguyen T. T. Genomic conservation of cattle microsatellite loci in wild gaur (*Bos gaurus*) and current genetic status of this species in Vietnam / T. T. Nguyen, S. Genini, L. C. Bui, P. Voegeli, G. Stranzinger, J. P. Renard, J. C. Maillard, B. X. Nguyen // BMC Genet. — 2007. — № 6. — P. 77.
18. Gutierrez E. Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implications for conservation / E. Gutierrez, S. Kalinowski, W. Boyce, P. Hedrick // Conservation Genetics. — 2000. — № 1 (1). — P. 3–15.
19. Poissant J. Genome-wide cross-amplification of domestic sheep microsatellites in bighorn sheep and mountain goats / J. Poissant, A. B. Shafer, C. S. Davis, J. Mainguy, J. T. Hogg, S. D. C. tñ, D. W. Coltman // Mol Ecol Resour. — 2009 — № 9(4). — P. 1121–6.
20. Abad-Zavaleta J. Genetic diversity analysis of two desert bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*) population in Mexico / J. Abad-Zavaleta, A. M. Sifuentes-Rincon, A. Lafon-Terrazas, J. Gutierrez-Alderete, E. Gonzalez-Rodriguez, J. A. Ortega-Gutierrez, S. Del Moral, C. A. Meza-Herrera // Tropical and Subtropical Agroecosystems. — 2011. — № 14. — P. 171–178.
21. Worley K. Population genetic structure of North American thin horn sheep (*Ovis dalli*) / K. Worley, C. Strobeck, S. Arthur, J. Carey, H. Schwantje, A. Veitch, D. W. Coltman // Molecular Ecology. — 2004. — № 13 (9). — P. 2545–2556.
22. Petit E. Genetic structure of populations of the Mediterranean mouflon (*Ovis gmelini*) / E. Petit, S. Aulagnier, R. Bon, M. Dubois, B. Crouau-Roy // Journal of Mammalogy. — 1997. — № 78 (2). — P. 459–467.
23. Sadeghi B. Genetic Diversity of Tandureh Mouflon Population / B. Sadeghi // Acta Vet Eurasia. — 2018. — № 44. — P. 20–25.
24. Nei. M. Molecular Evolutionary Genetics, Columbia University Press, New York, 1987
25. Peakall R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update / R. Peakall, P. E. Smouse // Bioinformatics. — 2012. — № 28. — P. 2537–2539
26. Huson D. H. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies / D. H. Huson, D. Bryant // Molecular Biology and Evolution. — 2006. — № 23 (2). — P. 254–267.
27. Prichard J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Prichard, M. Stephens, P. Donnelly // Genetics. — 2000. — № 55. — P. 945–959.
28. Hartl D. L., Clark A. G. Principles of population genetics, United Kingdom: Sunderland, 1997.
29. Deniskova T. E. Comparative Analysis of the Effectiveness of STR and SNP Markers for Intraspecific and Interspecific Differentiation of the Genus *Ovis* / T. E. Deniskova, A. A. Sermyagin, V. A. Bagirov, I. M. Okhlopov, E. A. Gladyr, R. V. Ivanov, G. Brem, N. A. Zinovieva // Russ. J. Genetics. — 2016. — № 52(1). — P. 79–84.
30. Vigne J. D. The origins of animal domestication and husbandry: a major change in the history of humanity and the biosphere / J. D. Vigne // C R Biol. — 2011. — № 334 (3). — P. 171–181.