
ДНК АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ КОЗЛЫНЫХ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ В УЗБЕКИСТАНЕ

Кучбоев А.Э¹, Амиров О.О¹, Каримова Р.Р¹, Рузиев Б.Х², Абраматов М.Б³.

¹Институт зоологии Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, abdurakhimkuchboev@gmail.com

²[Каршинский государственный университет, Карши.](#)

³[Термезский государственный университет, Термиз](#)

Абстракт

Мы использовали видоспецифичные праймеры 16S РНК для амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации вида. Результаты молекулярного анализа с геном 16S позволяли идентифицировать *Capra sibirica*, *C.falconeri* и *C.hircus* принадлежащие к подсемейству Caprinae с помощью неинвазивный метод генетический отбор проб. Данный способ довольно прост в использовании, при этом позволяет избежать прямого контакта с животным, что минимизирует как степень воздействия на изучаемый объект и не требует существенных материальных и трудовых затрат исследователей. The protocol developed could be a valuable tool in the management and conservation of the *Capra* species occurring on the Uzbekistan.

Основными представителями диких жвачных животных являются виды семейства полорогих (Bovidae). В настоящее время семейство полорогих объединило 143 вида, что составляет почти 55 % копытных. В странах СНГ встречается 15 видов.

В Узбекистане из полорогих животных встречаются 6 видов и 4 подвида: *Capra sibirica*, *C.falconeri*, *Ovis vignei* (*O.v.arcal*, *O.v.bochariensis*), *Ovis ammon* (*Ovis a.severtzovi*, *O.a.karelini*), *Saiga tatarica*, *Gazella subgutturosa*, из которых 5 видов занесены в Красную книгу Республики Узбекистан и Красный список МСОП (IUCN) (Красная книга Республики Узбекистан, 2019).

Дикие козы (*Capra* Linnaeus, 1758) образуют группу копытных, распространенных в горных районах юга Палеарктики, причем самый древний вид *Capra prisca* считается близким к виду *C.aegagrus* (Geptner and Naumov, 1961). Классификация рода *Capra* является одной из сложных проблем в современной систематике копытных животных. Вопрос о количестве видов этого рода до сих пор остается неясным. По данным разных авторов, этот род включает от одного до одиннадцати видов. В работе Haltenorth (1963) капры включают 2 вида, в качестве первого - представлен мархур, а все остальные виды коз представлены в качестве второго вида. В сведениях Pidancier et al. (2006) козы подразделяются на девять видов. А в работах V.I.Sokolov (1959) дикие козы представлены восемью видами: бозоаровый козёл (*C.aegagrus*), горный козёл (*C.ibex*), сибирский горный козел (*C.sibirica*), нубийский горный козёл (*C.nubiana*), пиринейский козел (*C.pyrenaica*), винторогий козёл (*C.falconeri*), кубанский тур (*C.caucasica*) и дагестанский тур (*C.cylindricornis*). В то же время сюда входят домашние козы, которые являются космополитами. Базовое опорно-двигательное тело диких и домашних коз одинаковое и поэтому они могут свободно спариваться на природе.

Сибирский горный козел (*C.sibirica*) обитает на горных массивах Центрального и северо-восточного Афганистана, Китая, Северо-западной Индии, Южного и Восточного Казахстана, Кыргызстана, Монголии, Северного Пакистана, России, Таджикистана и на горных хребтах в Северо-восточном Узбекистане (Reading et al., 2020). Сибирский горный козел (*C.sibirica*) на основе различий в общем размере, габитусе и размере рогов, а также цвете меха классифицируется на четыре подвида: *C.s.sibirica*, *C.s.alaiana*, *C.s.hagenbecki*, *C.s.sakeen* (Castello et al., 2016).

Популяции винторогого козла (*C.falconeri*) в настоящее время сохранились в южных приграничных регионах Таджикистана, Афганистана, Пакистана, Узбекистана и Туркменистана, а также в северных регионах Индии. На сегодняшний день самая большая популяция этого вида обитает в Пакистане, но в последние годы она также сокращается (Weinberg et al., 1997).

Недавние исследования представителей рода *Capra*, основанные на их митохондриальной ДНК (мтДНК) показали, что сибирский горный козел и нубийская горная коза представляют собой отдельные виды, которые по природе не очень тесно связаны с альпийским горным козлом (*C.ibex*). Альпийские козы с

пиринейскими козами (*C.pyrenaica*) образуют одну (единую) группу. А западно-кавказский вид более тесно связан с дикими козами, чем с восточно-кавказским видом. Винторогий козёл является отдельным видом по сравнению с другими формами и считается отдельной ветвью этого рода (Heptner, 1989).

В настоящее время винторогий козёл разделяется на 3 подвида (*C.f.falconeri*, *C.f.heptneri*, *C.f.megaceros*) (Castello et al., 2016). Используя участок COI мтДНК, выделенных из образцов крови 28 винторогих коз, которые содержатся в четырех зоопарках Европы, вид *C.falconeri* разделён на два подвида: это бухарский винторогий козёл *C.f.heptneri* и пряморогий винторогий козёл *C.f.megaceros* (Sabine et al., 2008).

Дикие и домашние козлы – представители рода *Capra*, широко распространенные в Палеарктике. На территории Узбекистана встречаются сибирские горные козлы (*Capra sibirica*), козероги (*C. falconeri*) и домашние козлы (*C. hircus*). Эти животные распространены в горных, степных и пустынных районах нашей Республики, где питаются травами пастбищ и выступают основными хозяевами многих гельминтов, являющихся важными компонентами биогеоценоза (Кучбоев и др., 2015).

Целью данной исследовательской работы является проведение молекулярной идентификации представителей *C.sibirica*, *C.falconeri* и *C.hircus* из рода *Capra*, распространённых в Узбекистане.

Сбор материала. Образцы фекалий видов рода *Capra* был собран в местах предполагаемого обитания животных из “Гиссарского государственного заповедника” при Государственном Комитете экологии и охраны окружающей среды Республики Узбекистан и “Угам-чаткальского государственного национального природного парка” при Государственном Комитете лесного хозяйства Республики Узбекистан, из вольеров Термезского зоопарка, а также скотобоев (где содержится домашние козы) расположенных в городе Ташкенте. Образцы экскрементов собирались случайным образом вдоль троп, и для большинства образцов экскрементов записывалось положение системы географического позиционирования (GPS). Образцы экскрементов фиксировали в сликгаеле или в этаноле хранили при комнатной температуре до выделения ДНК.

Работа с экскрементами. Наибольшая концентрация генетического материала находится на внешней поверхности экскрементов, которые были в прямом контакте с эпителиальными мембранами животного. Срезается внешняя часть фекального материала, чтобы максимизировать количество ДНК хозяина и свести к минимуму попадание экзогенной ДНК. Большинство наборов для экстракции ДНК требуют максимум 0,80-1,20 г фекального материала.

Образцы крови и тканей домашних коз были собраны из скотобоев в городе Ташкента. Образцы тканей включали мышцы и кожу, полученные от охотников, зимних убийств и ушей пойманных животных, а также кости, кровь и свежие волосы.

Выделение ДНК.

ДНК из фекалий была выделена несколькими наборами согласно протоколу компании-производителя. Лучший результат был получен при использовании набора PereLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, USA) для фекалий.

Геномная ДНК из всех фекальных образцов представителей рода *Capra* был выделен с помощью набора реагентов GeneJET Genomik DNK (Thermo Fisher Scientific, USA) и крови и тканей с набора Diatom DNA Prep 200 (Россия) по протоколу производителя. Кроме того, все экстракции проводились на специальном лабораторном столе и в лаборатории репликации полимеразной цепной реакции (ПЦР) во избежание загрязнения.

Проверка геномной ДНК

Концентрация и качество выделенной гДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Scientific™) в пределах динамического диапазона прибора при соотношении длины волны поглощения 260нм/280нм (согласно протоколу производителя). Все образцы имевшие значения в диапазоне 1,7-2,0 допускались до следующего этапа и разводились до концентрации 10нг/мкл. Дополнительно, наличие и чистоту гДНК проверяли в 0,8% агарозном геле.

ПЦР- амплификация. Для амплификации геномной ДНК была поставлена реакция с помощью нуклеотидных праймеров (F-5' CGAGGGCTTTACTGTCTCTT -3'; R-5' CCTATTGTCGATATGGACTCT-3') участка 16S рибосомальной ДНК (Caragiulo et al., 2013) с использованием набора реактивов (10x ПЦР буфер, раствор dNTP, Taq-полимераза, стерильная вода) фирмы «Силекс» (Россия). Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) осуществлялась с помощью автоматического программного амплификатора (Touchgene Gradient, UK).

ПЦР проводили по следующей схеме: 1 этап - денатурация ДНК при 94°C в течение 5 мин, 2 этап - денатурация ДНК при 95°C 45 секунд, 3 этап - отжиг праймеров при 55°C 45 секунд, 4 этап - элонгация цепи при 72°C 1 мин 40 секунд, 5 этап - элонгация цепи при 72°C 5 минут. Этапы со 2 по 4 повторялись циклически 35 раз.

Проведение гель-электрофорез. Для визуализации продуктов ПЦР проведен электрофорез в 2 % агарозном геле. Образцы продуктов ПЦР наносили в лунки геля в объеме 25 мкл. Разделение фрагментов проводили при напряжении 80 вольт/см, в горизонтальном геле длиной 15 см. Для определения размера продуктов, в крайнюю лунку геля наносили маркер молекулярной массы с градацией по 100 п.н. (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder).

Секвенирование

Продукты ПЦР были секвенированы в обоих направлениях с помощью праймеров, используемых для амплификации ДНК (Центр передовых технологий Министерства инновационного развития Республики Узбекистан, г. Ташкент).

Нуклеотидная последовательность участка 16S вида *Gazelle subgutturosa* (Güldenstaedt, 1780) была включена в качестве внешней группы для дерева консенсуса. Полученное филогенетическое дерево было проанализировано и отредактировано на программе iTOL v6.6.

Получена нуклеотидная последовательность по 300 парным нуклеотидам участка мтДНК 16S из ДНК генетических образцов, выделенных из видов *C.hircus*, *C.sibirica* и *C.falconeri* рода *Capra*. Все образцы помета были проверены на видовую идентификацию с использованием видоспецифичных праймеров, амплифицирующие участки 16S митохондриальных генов.

Выравнивание и анализ полученной нуклеотидной последовательности проведено с помощью Bioedit, Clustal W, DNASTAR™ и специальной компьютерной программы RAUP4 (таблица).

Таблица

Сравнение нуклеотидных последовательностей митохондриальной ДНК 16S видов рода *Capra* и базы Генбанк

№	Виды коз	1	2	3	4	5	6
1	<i>C. hircus</i> Uzb	-	0,06	2,3	2,7	2,7	2,7
2	<i>C. hircus</i> MH229952	2	-	3,0	3,4	3,4	3,4
3	<i>C. falconeri</i> Uzb	7	9	-	0,3	1,0	1,7
4	<i>C. falconeri</i> OP722695	8	10	1	-	1,3	1,3
5	<i>C. sibirica</i> Uzb	8	10	3	4	-	0,6
6	<i>C. sibirica</i> AF400655	8	10	5	4	2	-

В таблице видно, что между видом *C. hircus* Uzb из рода *Capra* и образцом из базы Генбанк (*C. hircus*: MH229952) существует отличие в двух нуклеотидах, разница которых составила 0,06%. У домашней козы и винторогого козла (*C.falconeri* Uzb) выявлено отличие по 7 нуклеотидам (2,3%), а с видом *C.sibirica* Uzb - по 8 нуклеотидам (2,7%).

Между видом *C.falconeri* и другими представителями рода *Capra* выявлены отличия в следующих нуклеотидах: с видом *C.falconeri* (OP722695) выявлено отличие в одном нуклеотиде (0,3%), с видом *C.hircus* - отличие в 8 нуклеотидах (2,3%), а с видом *C.sibirica* - в 3 нуклеотидах (1%).

Отмечено, что в нуклеотидных последовательностях вида *C.sibirica* и видов *C.hircus* и *C.falconeri* также были выявлены отличия (таблица 2).

На основе нуклеотидных последовательностей участка мтДНК 16S видов *C.sibirica*, *C.falconeri* и *C.hircus*, полученных на основе результатов молекулярно-генетического исследования и результатов нуклеотидной последовательности видов полученных из базы Генбанк, относящихся к этому роду, изучены их филогенетические связи 9 видов козлов (рисунок 1). Как показали исследования на основе мтДНК представителей рода *Capra*, выявленный на территории Узбекистана вид *C.falconeri* на 98-99% схож с подвидами *C.falconeri* (OP722695), *C.falconeri* (OW568856) и *C. falconeri* (NC020622). Коза *C.sibirica* Uzb на 98% усилена показателями бутестрапа к образцам *C.sibirica* (OW568913) и *C.sibirica* (AF400655). Домашние козы (*C. hircus*) также составили 100% (рисунок).

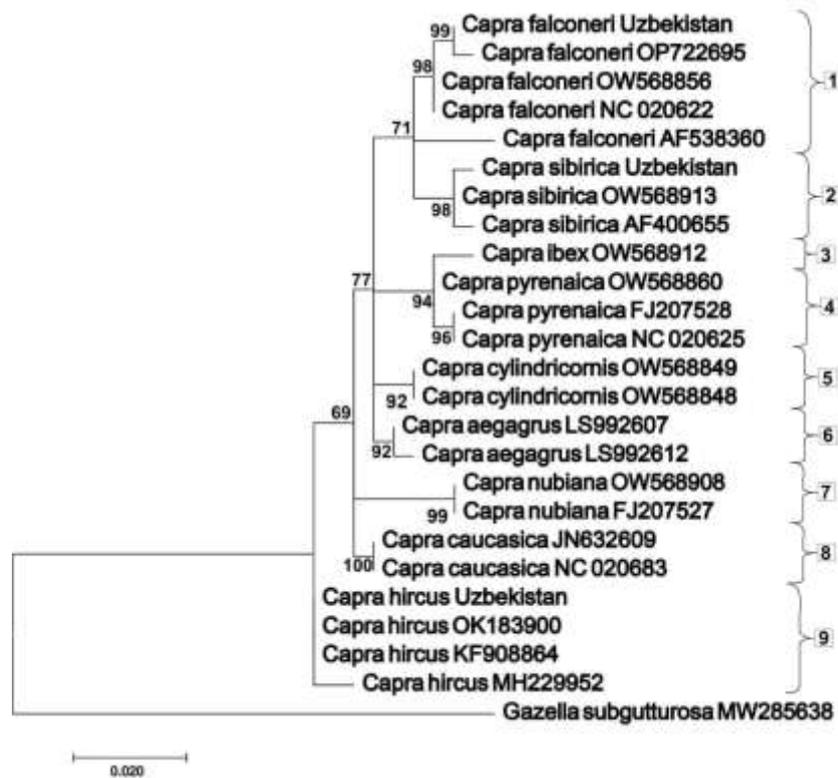


Рисунок. Филогенетическое дерево видов рода *Capra* в методе максимального правдоподобия (ML) на основе анализа 16S рДНК.

Следует отметить, что коза *C. ibex* и коза *C. pyrenaica* составили одну группу. Это сведение объясняет близость выводов, представленных Neptner (1989). На филогенетическом дереве кавказские козы (*C. caucasica*, *C. cylindricornis*) и Нубийские козы (*C. nubiana*) составили отдельную группу.

Молекулярный анализ гена 16S ДНК позволяет идентифицировать все генетически изолированные виды *Capra sibirica*, *C. falconeri* и *C. hircus* принадлежащие к подсемейству Caprinae с помощью неинвазивный метод генетический отбор проб. Мы считаем, что генетический отбор проб становится одним из наиболее эффективных и точных методов оценки численности популяций животных и выявления присутствия редких видов. Филогению капры можно лучше изучать более длинные последовательности и анализируя множество образцов каждого вида со всего географического ареала. Кроме того, для выявления эволюционных взаимоотношение рода *Capra* требуется также анализ ядерной ДНК.

Как известно, редкие виды требуют особого внимания, регулярного мониторинга их природных популяций, сохранения видового разнообразия и всестороннего углубленного изучения с использованием молекулярно-генетического анализа в дополнение к классическим систематическим методам. Полученные нуклеотидные последовательности особо охраняемых и редких видов диких коз депонированы в Генбанк (NCBI) (*C. falconeri* - OP722695; *C. sibirica* - OR234744) и значимо пополняют коллекции национального достояния Республики Узбекистан.

Список использованной литературы

1. Красная Книга Узбекистана. Ташкент, 2019. 2-том. С. 323-352.
2. Castelló J.R., Huffman B., Groves C. Bovids of the World: Antelopes, Gazelles, Cattle, Goats, Sheep, and Relatives. Princeton University Press, 2016. P. 113-114.
3. Geptner V.G., Naumov N.P. Mammals of the Soviet Union. Moscow: Vysshaya Shkola, 1961, 1. P.141.
4. Caragiulo A, Isabela Dias-Freedman I, Clark J. A, Rabinowitz S, Amato G. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography of Neotropic pumas (*Puma concolor*) // Mitochondrial DNA, 2013.

DOI:10.3109/19401736.2013.800486

5. Haltenorth T. Klassifikation der Säugetiere: Artiodactyla. Handbuch der Zoologie, 1963, vol. 8, no. 32(18). P. 1-167.
6. Hammer Sabine E., Schwammer H.M., Suchentrunk F. Evidence for Introgressive Hybridization of Captive Markhor (*Capra falconeri*) with Domestic Goat: Cautions for Reintroduction. *Biochem Genet*, 2008. Vol: 46(3-4). P. 216-226.
7. Heptner V.G., Nasimovitch A.A., Bannikov A.A. Mammals of the Soviet Union: Artiodactyla and Perissodactyla. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 1988. 1. P. 1-1147.
8. Pidancier N., Jordan S, Luikart G et al. Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia, Artiodactyla): discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006; 40(3). P. 739-749.
9. Reading R., Michel S., Suryawanshi K., Bhatnagar Y.V. *Capra sibirica*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2020. P. 122.
10. Sokolov V.I. Fauna of USSR. Mammals: Ungulate (Orders Perissodactyla and Artiodactyla), Moscow: Akad. Nauk SSSR, 1959, 1(3). P. 79-81.
11. Weinberg P.I., Valdez R., Fedosenko A.K. Status of the Heptner's Markhor (*Capra falconeri heptneri*) in Turkmenistan. *J Mammal*, 1997, 78. P. 826-829.
12. Kuchboev A.E., Krucken J., Ruziev B.H., Von Samson-Himmelstjerna G. Molecular phylogeny and diagnosis of species of the family Protostrongylidae from caprine hosts in Uzbekistan// *Parasitology Research*. 2015, Volume: 114 (4): - P. 1355-1364.
13. Raes J., Van de Peer Y. ForCon: a software tool for the conversion of sequence alignments // *Embnet. News*. 1999. Vol.6. P.10-12.
14. Hall, T.A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98
15. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 11, 22 (22), 4673-80. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
16. Stecher, G., K. Tamura, S., Kumar. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macos. *Molecular Biology and Evolution*, 2020, 37:1237 - 1239. P. doi.org/10.1093/molbev/msz312.
17. Nicholas K., Nicholas H. 1997. Gene Doc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <http://www.wpscedu/biomed/genedoc>