







Research Paper

<https://doi.org/10.5564/pib.v38i1.2546>

PROCEEDINGS OF
PIB
THE INSTITUTE OF BIOLOGY

Optimization and usability test result of multiplex PCR and fragment analysis method in microsatellite study of Mongolian Argali sheep populations

Baatar DELGERZUL¹ , Zunduinbaatar UNUDBAYASGALAN¹ , Jal TUMURSUKH²,
Shagdarjav NAMSRAIJAV³, Khurelbaatar TSEGMIDZAYA⁴, Tumurchudur MUNKHBAT⁵,
Gansukh SUKHAATAR⁵, Sukhbaatar AMGALANBAATAR⁶, Soyol BAASANKHUU⁷ ,
Batsukh TSERENDULAM^{1*} 

¹Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

²Administration of Ulaan Taiga Specially Protected Areas, Khuvsgul, Mongolia

³Administration of Ikh Gazriin Chuluu National Park, Dundgovi, Mongolia

⁴Administration of Otgon Tenger Specially Protected Areas, Zavkhan, Mongolia

⁵Save Argali Sheep Non-Government Organization, Uvurkhangai, Mongolia

⁶Argali and Wildlife Research Center, Ulaanbaatar, Mongolia

⁷Laboratory of Paleozoology, Institute of Paleontology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding authors: tserendulamb@mas.ac.mn, <https://orcid.org/0000-0002-8409-0968>

Abstract. Studying the genetic diversity of Mongolian Argali sheep populations using microsatellite loci requires an accurate and world-standard method than Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Therefore, in this study, we developed a multiplex PCR for 3 high polymorphism loci (BM302, INRA040, BM4505) using fluorescent labeled primers (FAM, HEX, TAMRA), and tested the usability of this methodology to simultaneously amplify the alleles of multiple microsatellite loci in a short amount of time. Using our multiplex PCR method, the alleles of those 3 loci were successfully amplified on a total of 99 samples from the Altai, Gobi, Khangai, and Khoridol Saridag populations, and their allele lengths were determined by the fragment analysis method. General genetic parameters were evaluated to determine the observed length of alleles on each microsatellite locus that was suitable for research. The number of alleles (N_a) observed in Altai (15.00), Gobi Desert (16.67), and Khangai (13.33) populations were relatively high, while in the Khoridol Saridag population, it was lower (9.00). The number of effective alleles (N_e) was comparatively low in Altai (6.73), Gobi Desert (8.02), and Khoridol Saridag (4.2) populations, but considerably uniform in the Khangai population (9.94). Moreover, observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) was highest in Altai (0.80, 0.84), Gobi (0.74, 0.87), and Khangai (0.85, 0.89) populations. Although the genetic diversity of the BM302, BM4505, and INRA040 loci was high, the majority of the detected alleles had low frequency. In conclusion, multiplex PCR was successfully optimized and the amplified fragments were analyzed which resulted in preliminary population genetic results in a short period. Future research utilizing this multiplex PCR and fragment analysis methodology should be conducted with more microsatellite markers, leading to precise results concerning the conservation genetics of Argali sheep.

Keywords: optimization of multiplex PCR, population genetic parameters, microsatellite loci BM302, BM4505, and INRA040, Argali sheep

Received 28 September 2022; received in revised form 25 December 2022; accepted 27 December 2022

© 2022 Author(s). This is an open access article under the [CC BY-NC 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Introduction

Argali sheep is a wild sheep belonging to the genus *Ovis* and distributed in Central Asia, the Altai Mountains,

the Himalayas, and the Southern part of Siberia [1]. The 7 known species of sheep (*Ovis*) are domestic sheep (*Ovis aries*), Argali sheep (*Ovis ammon*), bighorn sheep (*Ovis canadensis*), narrow-horned sheep (*Ovis dalli*),

mouflon (*Ovis gmelina*), and snow sheep (*Ovis nivicola*), which the largest in terms of body size is the Argali sheep. According to morphology and geographic distribution, there are nine subspecies of Argali sheep, and current genetic investigations support this [1], [2], [3].

Since Argali sheep graze and dwell between 400 and 5,500 meters above sea level, they are primarily found in the Mongolian highland regions [4]. Although it is believed that there are 2 subspecies of Argali sheep in Mongolia, this classification is still controversial among researchers [2], [3], [5]. In Mongolia, there are several populations of Argali sheep: Altai and Khangai Mountains, and Gobi Deserts including Trans-Altai. There are also small isolated populations in the Khoridol Saridag Mountains, the headwaters of the Arsain River, and the southern parts of the Khentii Mountains [4], [6], [7]. There is a wealth of knowledge regarding the genetic flow between populations as well as the distribution of Argali sheep subspecies in Mongolia.

Argali sheep are considered to be a critically endangered on a global scale, and their populations have been dropped recently throughout the range [4]. The Argali sheep's population and range are getting smaller every year, and human activities like overpopulation and pasture depletion [8], [9] and illegal hunting, as well as trophy hunting that is not supported by research, are the main causes of its scarcity.

Although Argali sheep are listed as rare animals in Mongolia and the Red Book, there aren't any studies on population genetics and molecular biology for long-term conservation management [10]. Microsatellite loci-based studies play an important role in conservation genetics study, and many microsatellite loci need to be studied to obtain optimal results [11]. Microsatellites are short repetitive oligonucleotide sequences. Microsatellite alleles vary in length depending on the number of repeats. Therefore, the analysis of microsatellite markers is based on the length of their alleles, so the fragment analysis method has been widely used in recent years [11], [12]. Fragment analysis is a technique which sizes product length of a polymerase chain reaction (PCR) using fluorescent dye-labeled primers and comparison with a standard marker by wavelength absorption. Also, since it is necessary to determine the length of multiple microsatellite locus alleles in population genetics research, it is more convenient to use a multiplex PCR method, which uses 2

or more primers at different sites in one PCR reaction [13].

Therefore, in this study, we tested the usability of optimized multiplex PCR method to our laboratory level and the world standard fragment analysis method using 3 representative loci with high polymorphism (BM302, INRA040, BM4505) for studying the genetic diversity of the Altai, Khangai, Khoridol Saridag, and Gobi Desert populations of Argali sheep in Mongolia via microsatellite loci.

Table 1. Samples used in the study

Population	Altai	Gobi Desert	Khangai	Khoridol Saridag
Place of collection	Bayan-Ulgii, Khovd, Uvs	Umnugovi, Dornogovi, Khentii	Bayankhongor, Tuv, Uvurkhangai	Khuvsgul
Number of samples (n)	31	30	23	15

Materials and Methods

Genomic DNA extraction

In this study, we included a total of 99 tissue and fecal samples from Altai (n=31), Khangai (n=23), Gobi Desert (n=30), and Khoridol Saridag regions (n=15) (**Table 1**). DNA was isolated from the tissue samples using the Tissue and blood kit (Zanaspex, Ulaanbaatar, Mongolia), and DNA from the fecal samples using the fecal DNA isolation method developed by our laboratory [14]. Each isolated DNA concentration was determined by a spectrophotometer (Nanogenius, Mapada Inc.) and used for further studies.

Multiplex PCR

Multiplex PCR with 3 microsatellite markers was performed using 2x Multiplex PCR kits (2x Multiplex PCR kit, Zanaspex) for each isolated genomic DNA sample. Multiallelic microsatellite loci are often used as markers to determine genetic diversity. As a result, we chose INRA040, BM302, and BM4505 with high polymorphism or more than 8 alleles from standard primers of mountain ungulates as representative loci [15]. The dimerization of primers with each other was calculated using Multiple Primer Analyzer software (Thermo Fisher Scientific). Following nucleus microsatellites primers labeled with 3 different fluorescent dyes (FAM, HEX, TAMRA) were

used: 5'FAM-INRA040 (blue) F: TCA GTC TCC AGG AGA GAA AAC; INRA040 R:CTC TGC CCT GGG GAT GAT TG; 5'HEX-BM302 (green) F: GAA TTC CCA TCA CTC TCT CAG C; BM302 R:GTT CTC CAT TGA ACC AAC TTC A; 5'-TAMRA BM4505 (red) F: TTA TCT TGG CTT CTG GGT GC; BM4505 R: ATC TTC ACT TGG GAT GCA GG. The touchdown PCR was carried out according to the method of Maudet *et al.* [15] The annealing temperature was adjusted to decrease by 1°C in each cycle from 55°C to 45°C in the first 10 cycles and a constant 45°C for the remaining 25 cycles.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) – To verify the success of the multiplex PCR, 10 µl of the multiplex PCR product was run on a 10% polyacrylamide gel at 100 V for 1.5 hours. Polyacrylamide gels were prepared with 10% Acrylamide: Bisacrylamide (29:1), 1x TBE, 0.07% APS, and 0.08% TEMED. After running, gels were stained with silver nitrate to observe microsatellite alleles. Staining was carried out in a shaker in 1% HNO₃ for 10 minutes, 0.1% AgNO₃ for 20 minutes, and 3% Na₂CO₃ until visible DNA bands appear, and formaldehyde was used for staining with 3% Na₂CO₃. After each staining, the stained gel was rinsed with distilled water and visualized on a gel documentation apparatus (Bio-Rad).

Fragment analysis – Successful multiplex PCR products were sent to Macrogen, South Korea for allele length reading. Allelic lengths at the nuclear microsatellite loci BM302, INRA040, and BM4505 were determined using

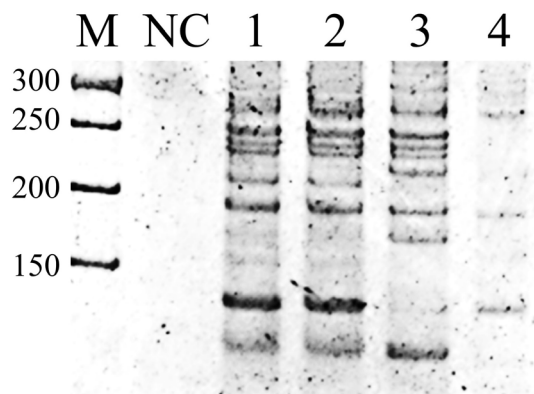


Fig. 1. Example multiplex PCR product of microsatellite BM302, INRA040, BM4505 loci in each Argali sheep population by PAAG electrophorogram: M- marker, NC – negative control, 1) Altai, 2) Gobi Desert, 3) Khangai, 4) Khoridol Saridag.

Peak Scanner 2.0 (Thermofisher) software and compared to the lengths generated by conventional DNA markers. To verify whether the determined allele lengths can be used in the study of the Argali sheep population, the general genetic parameters of population genetics such as the number of alleles (Na), number of effective allele (Ne), Shannon index (I), observed heterozygosity (Ho), effective heterozygosity (He) at each locus in each population was calculated using GeneAlex v6 software.

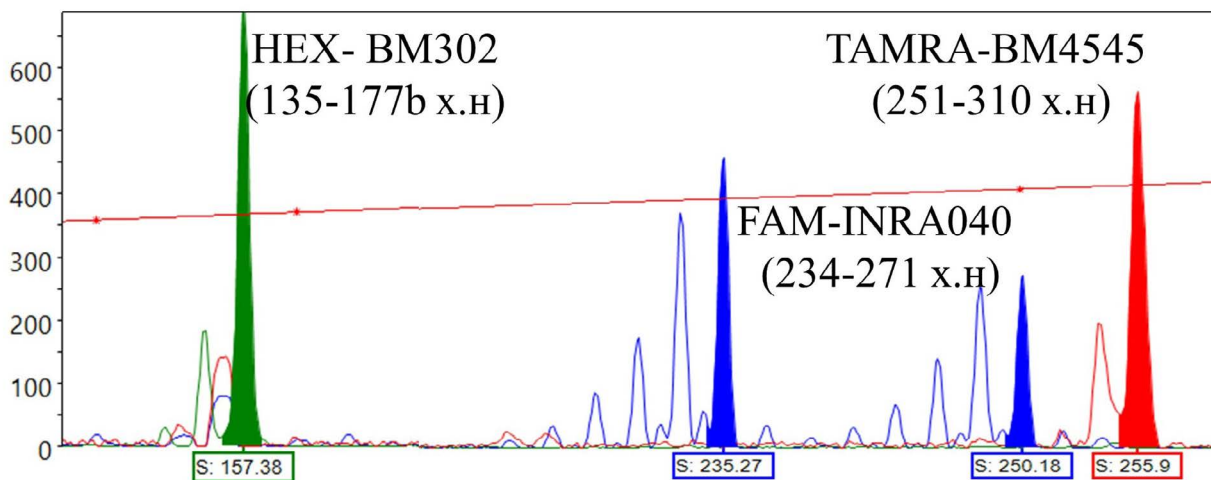


Fig. 2. Alleles of the HEX-BM32 (green), FAM-INRA040 (blue), and TAMRA-BM4505 (red) loci visualized in Peak Scanner 2.0 (Thermofisher). The alleles of loci were detected as follows: 157 bp allele at the BM32 locus, 235 bp and 250 bp alleles at the INRA040 locus, and a 256 bp allele at the BM4505 locus.

Table 2. Genetic parameters of 3 microsatellite loci in Altai, Gobi Desert, Khangai, and Khoridol Saridag populations of Argali sheep.

Population	Locus	Na	Ne	Ho	He
Altai (n=31)	INRA040	16.000	7.392	0.935	0.865
	BM302	12.000	4.609	0.677	0.783
	BM4505	17.000	8.214	0.806	0.878
	Average	15.000	6.738	0.806	0.842
Gobi Desert (n=30)	INRA040	16.000	6.642	0.867	0.849
	BM302	17.000	8.955	0.733	0.888
	BM4505	17.000	8.491	0.633	0.882
	Average	16.667	8.029	0.744	0.873
Khangai (n=23)	INRA040	14.000	9.981	0.913	0.900
	BM302	11.000	6.782	0.783	0.853
	BM4505	15.000	13.062	0.870	0.923
	Average	13.333	9.942	0.855	0.892
Khoridol Saridag (n=15)	INRA040	11.000	3.913	0.600	0.744
	BM302	9.000	5.921	0.733	0.831
	BM4505	7.000	2.778	0.600	0.640
	Average	9.000	4.204	0.644	0.739

Na = observed number of alleles, Ne = effective number of alleles,
Ho = observed heterozygosity, He = expected heterozygosity

Results

We aimed to use a world-standard method to determine the allele length at the microsatellite locus with high accuracy using the genetic analyzer for the diversity study of Argali sheep populations of Altai, Gobi, Khangai, and Khoridol Saridag in Mongolia. The microsatellite marker BM302, INRA040, and BM4505 primers used in the study did not form dimers when calculated using the Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific) programs, so in order to save time, the conditions of multiplex PCR were adjusted and the alleles in the loci were successfully amplified when running it on 10% PAGE further staining with silver nitrate (**Fig. 1**). The results of each sample from each population are displayed in Fig. 1.

Multiplex PCR of BM302, INRA040, and BM4505 loci was performed on 99 samples of Argali sheep and sent to MacroGen for length determination. Viewing the read response using Peak Scanner 2.0 (ThermoFisher) software revealed 1 or 2 alleles from each of the BM302, INRA040, and BM4505 loci at the lengths as reported by Maudet *et al.* [15] (**Fig. 2**).

Length of the alleles at the BM302, INRA040, and BM4505 loci from 99 samples of Argali sheep were

individually recorded and analyzed using the Peak Scanner software. When the genetic parameters were calculated, the average number of alleles (Na) found at the three loci in the Altai, Gobi Desert, Khangai populations of Argali sheep was 15.00, 16.67, and 13.33, respectively. In the population of Khoridol Saridag, 9.00 alleles were found. While the Khoridol Saridag population had a number of effective allele (Ne) of 4.20 and an observed heterozygosity (Ho) of 0.64, the Altai, Gobi Desert, and Khangai populations had 6.73, 8.02, and 9.94 (Ne) as well as 0.80, 0.74, and 0.86 (Ho), respectively (**Table 2**).

Discussion

When microsatellite markers are used in population genetics, the differences in the length of products generated by PCR amplification of the microsatellite locus are analyzed. The simplest way to identify variations in the length of PCR products is by blotting them on PAGE. PAGE is suitable for determining the length of microsatellite alleles shorter than 200 bp and longer than tetranucleotide repeats [16], while fragment analysis can detect differences of 0.5 bp [16], [17]. In our previous study using PAGE methodology, only 3 alleles were detected in Altai and Gobi populations on the BM302 locus [2], however, in this study, 12 alleles were detected in the Altai population and 17 alleles in the Gobi Desert population. As a result, the number of alleles was discovered to be low when utilizing the PAGE technique since various di- and trinucleotide alleles couldn't be distinguished based on how they appeared on the gel. Therefore, the method of fragment analysis was stabilized in this work in order to more precisely and reliably quantify the number of alleles.

In addition, genetic studies using 8 or more microsatellite markers are necessary to fully determine the genetic structure of any population. PCR amplification of each microsatellite marker on multiple samples is time-consuming. Using the multiplex PCR method, the more markers that can be used in PCR simultaneously, the more time and reagents can be saved [13]. Therefore, in this study, multiplex PCR was successfully carried out by combining the microsatellite markers BM302, INRA040, and BM4505. As a result, our team has established a reliable multiplex PCR approach (**Fig. 1**). As observed by Maudet, fragment analysis of this multiplex

PCR result indicated proper length alleles of 135–177 kb, 234–271 kb, and 253–310 kb in each of the loci BM302, INRA040, and BM4505 [15].

By processing the allele data discovered by multiplex PCR and the fragment analysis method, the number of observed alleles (N_a), the number of effective alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), and expected heterozygosity at the BM302, INRA040, and BM4505 loci were examined to see if they could be used in the study of the Altai, Gobi, Khangai, and Khoridol Saridag populations of (Table 2).

N_a represents the number of alleles present in the population. The N_a (9.00) of the Khoridol Saridag population is lower than the N_a (15.00, 16.67, and 13.33) of the Altai, Gobi, and Khangai populations, which the reasons could be Khoridol Saridag population is an isolated community with few individuals and inadequate number of samples. In 2009, 32 head of Argali sheep were recorded in the population of Khoridol Saridag, and in 2017, 59 head of Argali sheep, according to a joint census conducted by the Laboratory of Genetics, MAS and the Administration of Ulaan Taiga SPAs [7], [18].

N_e gives a numerical figure for the predicted level of heterozygosity in the population and describes the number of alleles with the same frequency at a certain locus. N_e (6.73, 8.02) of the Altai and Gobi populations is significantly lower than N_a (15.00, 16.67), indicating that the majority of alleles are of low frequency in that population. This suggests that the majority of individuals in these populations contain high-frequency alleles that are dominant in the population, and few individuals contain unique alleles [19]. This low-frequency unique allele has a high probability of extinction from the population gene pool [20]. This is also observed in the Khoridol Saridag population ($N_a=9.00$, $N_e=4.2$). In the Khangai population, the allele frequency is relatively uniform compared to other populations ($N_a=13.33$, $N_e=9.94$).

The number of heterozygous individuals in the population is measured by H_o , and the genetic diversity by H_e . The higher the number of heterozygous individuals in a population, the lower the probability of the population experiencing inbreeding pressure [12]. The H_o of Altai, Gobi Desert, and Khangai populations are high (0.80, 0.74, and 0.86), which indicates that most of these populations have many heterozygous individuals. Also, all populations have high H_e (0.84, 0.87, 0.89, 0.73), suggesting high

genetic diversity. Populations with high N_a , H_o , and H_e values may be considered to have high genetic diversity, but low N_e values indicate that most variants of this genetic diversity occur at very low frequencies in the population. By keeping these variants in the population and increasing their frequency, the genetic diversity of Argali sheep can be preserved [21].

Summary

In this study of the Mongolian Argali sheep population, multiplex PCR conditions were optimized by microsatellite markers BM302, INRA040, and BM4505, alleles at these loci were amplified accurately, and the length of detected alleles was determined with high accuracy in a short period. In addition, the genetic diversity of the Altai, Gobi Desert, Khangai, and Khoridol Saridag populations of Argali sheep is high, but most of the alleles are of low frequency. In the future, it is concluded that in order to obtain more accurate important information for the taxonomy and conservation of Argali sheep, it is necessary to increase the number of microsatellite markers in research using current tested methodology.

Acknowledgments

This study would not have been possible without the funding of Mongolian Foundation for Science and Technology (IIIyCc-2020/22). We also would like to express our sincere gratitude to the rangers of the Otgontenger National Park, Ch. Bat-ulzii and Sh. Enkhbuyant as well as rangers of the Ikh Gazriin Chuluu National Park, D. Munkh-Ochir, Kh. Erdenebat, and O. Erdene who provided deep support in collecting the sample materials for the research work.





References

- [1] “*Ovis ammon* - an overview | ScienceDirect Topics.” <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/ovis-ammon> (accessed Feb. 10, 2022).
- [2] B. Delgerzul, Z. Unudbayasgalan, T. Bilguun, C.

- Battsetseg, B. Galbadrahk, and B. Tserendulam, "Genetic comparison of Altai and Gobi argali sheep (*Ovis ammon*) populations using mitochondrial and microsatellite markers: Implication on conservation," *Proc. Mong. Acad. Sci.*, pp. 54–61, Dec. 2019, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23695>.
- [3] J. Feng, M. R. Frisina, M. S. Webster, and G. Ulziimaa, "Genetic Differentiation of Argali Sheep *Ovis Ammon* in Mongolia Revealed by Mitochondrial Control Region and Nuclear Microsatellites Analyses," *J. Bombay Nat. Hist. Soc.*, vol. 106, pp. 38–44, 2009.
- [4] "The IUCN Red List of Threatened Species," IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/en> (accessed Feb. 10, 2022).
- [5] T. T, R. Rr, R. Oa, Q. Tw, and R. Rp, "A population genetic comparison of argali sheep (*Ovis ammon*) in Mongolia using the ND5 gene of mitochondrial DNA; implications for conservation," *Mol. Ecol.*, vol. 13, no. 5, May 2004, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02123.x>.
- [6] J. Tumursukh, "Survey of rare and endangered game mammals in Khuvsgul," Mongolia, 1994.
- [7] C. Battsetseg, Z. Unudbayasgalan, J. Tumursukh, and Kh. Tumennasan, "Current population structure of argali sheep (*Ovis ammon*) in Khoridol Saridag," *Proc. Inst. Biol.*, vol. 28, pp. 12–13, 2018.
- [8] G. Wingard, "Dietary overlap between argali sheep and domestic livestock in Mongolia," *Grad. Stud. Theses Diss. Prof. Pap.*, Jan. 2005, [Online]. Available: <https://scholarworks.umt.edu/etd/6496>
- [9] Zahler *et al.*, "Illegal and Unsustainable Wildlife Hunting and Trade in Mongolia," *Mong. J. Biol. Sci.*, vol. 2, no. 2, 23-31, 2004, <https://doi.org/10.22353/mjbs.2004.02.14>.
- [10] S. J. O'Brien, "A role for molecular genetics in biological conservation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 13, pp. 5748–5755, Jun. 1994, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.5748>.
- [11] K. A. Selkoe and R. J. Toonen, "Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers," *Ecol. Lett.*, vol. 9, no. 5, pp. 615–629, May 2006, <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>.
- [12] K. S. Kim and T. W. Sappington, "Microsatellite Data Analysis for Population Genetics," in *Microsatellites*, vol. 1006, S. K. Kantartzi, Ed. Totowa, NJ: *Humana Press*, 2013, pp. 271–295. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_19.
- [13] D. Sint, L. Raso, and M. Traugott, "Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success," *Methods Ecol. Evol.*, vol. 3, no. 5, pp. 898–905, Oct. 2012, <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x>.
- [14] U. Zunduibaatar, B. Tsenddorj, and T. Batsukh, "DNA extraction method based on salting out method from caprine faecal sample," *Proc. Inst. Biol.*, vol. 34, pp. 203–209, 2018.
- [15] C. Maudet *et al.*, "A standard set of polymorphic microsatellites for threatened mountain ungulates (Caprini, Artiodactyla): PRIMER NOTE," *Mol. Ecol. Notes*, vol. 4, no. 1, pp. 49–55, Mar. 2004, <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00563.x>.
- [16] A. Karp, P. G. Isaac, and D. S. Ingram, Eds., *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*, 1. ed. London Weinheim: Chapman & Hall, 1998.
- [17] N. Mittal and A. Dubey, "Microsatellite markers- A new practice of DNA based markers in molecular genetics," *Pharmacogn. Rev.*, vol. 3, pp. 235–246, Jul. 2009.
- [18] Battsetseg Ch, Odbayar T, Tumursukh J, and Tumennasan Kh, "Current population structure of argali sheep (*Ovis ammon*) in Khoridol Saridag," *Proc. Inst. Biol.*, vol. 28, pp. 12–13, 2011.
- [19] BS Weir, *Intraspecific differentiation in Molecular systematic*, DM Hillis and C Moritz, Eds. Sinauer Associates, 1990.
- [20] M. V. Trotter and H. G. Spencer, "The generation and maintenance of genetic variation by frequency-dependent selection: constructing polymorphisms under the pairwise interaction model," *Genetics*, vol. 180, no. 3, pp. 1547–1557, Nov. 2008, <https://doi.org/10.1534/genetics.108.088880>.
- [21] R. R. Hudson, "Statistics in Genetics: Genetic Data Analysis. Methods for Discrete Population Genetic Data. Bruce S. Weir. Sinauer, Sunderland, MA" *Science*, vol. 250, no. 4980, pp. 575–575, Oct. 1990, <https://doi.org/10.1126/science.250.4980.575>.



Монгол орны аргаль хонины популяцуудын микросателлитын судалгаанд мультиплекс ПГУ ба фрагментийн анализын аргазүйг тогтворжуулан туршсан дүнгээс

Баатар ДЭЛГЭРЗУЛ¹ , Зундуйбаатар ӨНӨДБАЯСАЛАН¹ , Жал Төмөрсүх²,
 Шагдаржав НАМСРАЙЖАВ³, Хүрэлбаатар ЦЭГМИДЗАЯА⁴, Төмөрчөдөр МӨНХБАТ⁵,
 Гансүх СүХБААТАР⁵, Сүхбаатар АМГАЛАНБААТАР⁶, Соёл БААСАНХҮҮ⁷ ,
 Батсүх ЦЭРЭНДУЛАМ^{1*} 

¹Шинжлэх ухааны академи, Биологийн хүрээлэн, Генетикийн лаборатори, Улаанбаатар, Монгол Улс

²Улаан Тайгын улсын тусгай хамгаалалттай газар, Хөвсгөл аймаг, Монгол Улс

³Их Газрын Чулууны байгалийн цогцолборт газар, Дундговь аймаг, Монгол Улс

⁴Отгон Тэнгэрийн улсын тусгай хамгаалалттай газар, Завхан аймаг, Монгол Улс

⁵Аргалиа аварья төрийн бус байгууллага, Өвөрхангай аймаг, Монгол Улс

⁶Монголын аргаль, агнуур судлалын холбоо төрийн бус байгууллага, Улаанбаатар, Монгол Улс

⁷Шинжлэх ухааны академи, Палеонтологийн Хүрээлэн, Палеозоологийн лаборатори, Улаанбаатар, Монгол Улс

*Холбоо барих зохиогч: iserendulamb@mas.ac.mn, <https://orcid.org/0000-0002-8409-0968>

Хураангуй. Монгол орны аргаль хонины генетик олон янз байдлыг микросателлитын локусуудаар судлахад ПААГ-аас илүү өндөр нарийвчлалтай, дэлхийн стандартад нийцсэн фрагмент анализын аргазүйгээр хийх шаардлага тулгарсан. Ингэхдээ олон микросателлитын локусын аллелийг богино хугацаанд олшруулахын тулд бид флуоресценц 3 өөр өнгөтэй (FAM, HEX, TAMRA) бодисоор тэмдэглэсэн праймераар полиморфизм өндөртэй 3 локусыг (BM302, INRA040, BM4505) сонгон мультиплекс ПГУ-ын арга зүй боловсруулж, энэ аргазүйг цаашид ашиглах боломжийг турших зорилгоор энэ судалгааг хийв. Боловсруулсан мультиплекс ПГУ-ын арга зүйг ашиглан Алтай, Говь, Хангай, Хорьдол Сарьдагийн популяцуудын нийт 99 дээжид дээрх 3 локусын аллелиудыг амжилттай олшруулж, аллелийн уртыг тодорхойлсон. Түүнчлэн микросателлитын локус бүрийн аллелиудын урт нь судалгаанд ашиглахад тохиромжтой эсэхийг шалган ерөнхий генетик үзүүлэлтүүдийг тооцоход ажиглагдсан аллелийн тоо Алтай (15.00), Говь (16.67), Хангайн (13.33) популяцад их, Хорьдол Сарьдагийн популяцад харьцангуй бага (9.00) байв. Эффектив аллелийн тоо Алтай (6.73), Говь (8.02), Хорьдол Сарьдагийн (4.2) популяцад хэт бага, Хангайн (9.94) популяцад харьцангуй жигд, хүлээгдэж буй гетерозигот байдал Алтай (0.80, 0.84), Говь (0.74, 0.87), Хангайн (0.85, 0.89) популяцад хамгийн өндөр байв. BM302, BM4505, INRA040 локусуудын генетик олон янз байдал өндөр ч ихэнх аллелиуд нь бага давтамжтай байв. Үүнээс дүгнэхэд, энэхүү боловсруулсан мультиплекс ПГУ амжилттай тогтворжсон бөгөөд олшруулсан бүтээгдэхүүнд фрагмент анализ хийн генетик үзүүлэлтүүдийг тооцож богино хугацаанд популяцийн генетикийн судалгаанд ач холбогдолтой урьдчилсан дүнг гарган авав. Цаашид мультиплекс ПГУ, фрагмент анализын энэ арга зүйг ашиглан микросателлитын маркеруудын тоог нэмэгдүүлэн судалгааг үргэлжлүүлж аргалийн хамгааллын генетикийн илүү үнэн зөв дүгнэлт гаргах боломжтой гэж үзэв.

Түлхүүр үгс: мультиплекс ПГУ тогтворжуулалт, популяцын генетик үзүүлэлт, микросателлит BM302, BM4505, INRA040 локус, аргаль хонь

Хүлээн авсан 2022.09.28; хянан тохиолдуулсан 2022.12.25; зөвшөөрсөн 2022.12.27

© 2022 Зохиогчид. [CC BY-NC 4.0 лиценз](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Оршил

Аргаль хонь нь Төв ази, Алтайн нуруу, Гималайн нуруу, Сибирийн өмнөд хэсгээр тархацтай тугалмайтны овог, хониныхны төрөлд хамаарах зэрлэг хонь юм [1]. Хониныхны төрөл (*Ovis*)-д гэрийн хонь (*Ovis aries*), аргаль хонь (*Ovis ammon*), том эвэрт хонь (*Ovis canadensis*), нарийн эвэрт хонь (*Ovis dalli*), муфлон (*Ovis gmelina*), цасны хонь (*Ovis nivicola*) зэрэг 7 зүйл багтдаг бөгөөд эдгээрээс биеийн хэмжээгээр хамгийн том нь аргаль хонь юм. Судлаачид аргаль хонины морфологи болон тархац дээр тулгуурлан аргаль хонины 9 дэд зүйл байдаг гэж үздэг бөгөөд сүүлийн үеийн генетикийн судалгаанууд ч үүнийг баталдаг [1], [2], [3].

Аргаль хонь далайн түвшнээс дээш 400-5,500м өндөрт тархан, бэлчээрлэдэг учир өндөрлөгт оршдог Монгол орон нь аргаль хонины цөм байршил нутаг юм [4]. Монгол оронд аргаль хонины 2 дэд зүйл байдаг гэж үздэг хэдий ч, энэхүү ангилал нь судлаачдын дунд маргаан дагуулсаар байдаг [2], [3], [5]. Монгол оронд аргаль хонины Алтай, Говь, Хангай, Соёны нурууны салбар Сийлхэмийн нуруу, Транс-Алтай гэсэн хэд хэдэн тусдаа популяцууд бий. Мөн Хорьдол Сарьдагийн нуруу Арсайн голын эх, Хэнтий нурууны өмнөд хэсгээр тусгаарлагдсан жижиг популяцууд байдаг [4], [6], [7]. Монгол орны аргаль хонины дэд зүйлүүдийн тархац нь одоог хүртэл сайн судлагдаагүй бөгөөд популяцууд хоорондын генетик урсгалын талаарх мэдээлэл хомс байна.

Аргаль хонь нь олон улсад ховордож болзошгүй ангиллаар үнэлэгдсэн бөгөөд бүс нутгийн хэмжээнд сүүлийн жилүүдэд тоо толгой буурч байна [4]. Аргаль хонины тоо толгой, тархац нутаг жил ирэх тусам буурсаар байгаа бөгөөд ховордлын тэргүүлэх шалтгаанд хууль бус агнуур, судалгаа тооцоонд үндэслэгдээгүй спорт агнуур, малын тоо толгой хэт ихсэж бэлчээр хомсдох зэрэг хүний буруутай үйл ажиллагаа ордог [8], [9].

Аргаль хонь нь Монгол орны Улаан ном болон Монгол улсын ховор амьтны жагсаалтад тус тус орсон хэдий ч урт хугацааны хамгааллын менежмент хэрэгжүүлэхэд молекул биологи, популяцын генетикийн судалгаанууд нэн дутмаг байна [10]. Хамгааллын генетикийн судалгаанд

микросателлитын локусд суурилсан судалгаа чухал байрыг эзэлдэг бөгөөд оновчтой үр дүн гаргаж авахад олон тооны микросателлитын локусыг судлах шаардлагатай болдог [11]. Микросателлит нь богино урттай олигонуклеотидийн дараалал бүхий олон давтагдсан дараалал юм. Давталтын тооноос хамааран микросателлитын аллелиудын урт өөр өөр байдаг. Иймд микросателлитын маркерийн судалгаанд түүний аллелийн уртад үндэслэн анализ хийдэг тул фрагмент анализын арга зүйг сүүлийн жилүүдэд өргөнөөр ашиглаж байна [11], [12]. Фрагмент анализ нь флуоресценц будгаар тэмдэглэсэн праймер ашиглан олшруулсан полимеразан гинжин урвал (ПГУ)-ын бүтээгдэхүүний уртыг гэрлийн долгионы шингээлтээр өгөдсөн стандарт маркерийн урттай харьцуулж тодорхойлдог арга зүй юм. Мөн популяцын генетикийн судалгаанд олон тооны микросателлитын локусын аллелиудын уртыг тогтоох шаардлагатай тул олон микросателлитын локусын аллелиудыг нэг ПГУ-ийн урвалд өөр өөр сайт дээр 2 болон түүнээс дээш праймер ашиглан явуулдаг мультиплекс ПГУ гэх аргыг ашиглах нь илүү тохиромжтой байдаг [13].

Иймд бид энэ судалгаагаар Монгол оронд байдаг аргаль хонины Алтай, Говь, Хангай, Хорьдол Сарьдагийн популяцуудын генетик олон янз байдлыг микросателлитын локусуудаар судлахдаа дэлхийн стандартад нийцсэн фрагмент анализ хийх аргазүйг полиморфизм өндөртэй 3 локусаар (BM302, INRA040, BM4505) төлөөлүүлэн мультиплекс ПГУ-ын аргыг өөрийн лабораторийн төвшинд анх тогтворжуулан боловсруулж хийхийг зорив.

Судалгааны материал, аргазүй

Геномын ДНХ ялгах

Бид энэхүү судалгаанд Алтай (n=31), Хангай (n=23), Говь (n=30) болон Хорьдол Сарьдагийн бүс (n=15) нутгуудаас нийт 99 эдийн болон хорголын дээжийг судалгаанд хамруулав (**1-р хүснэгт**). Эдийн дээжээс Zanasrex эдээс ДНХ-ийг ялгах кит (Tissue and blood kit, Zanasrex), хорголын дээжээс манай лабораторийн боловсруулсан хорголоос ДНХ ялгах арга зүйг тус тус ашиглан ДНХ ялгав [14]. Ялгасан ДНХ-ийн концентраци тус бүрийг

спектрофотометрээр (Nanogenius, Mapada Inc.) шалгаж, цаашдын судалгаанд ашиглав.

1-р хүснэгт. Судалгаанд ашигласан дээж материалын мэдээлэл

Популяц	Алтай	Говь	Хангай	Хорьдол Сарьдаг
Цуглуулсан газар	Баян-Өлгий, Ховд, Увс	Өмнөговь, Дорноговь, Хэнтий	Төв, Баянхонгор, Өвөрхангай	Хөвсгөл
Дээжийн тоо (n)	31	30	23	15

Мултиплекс ПГУ

Ялгасан геномын ДНХ дээж бүрт 2х мултиплекс ПГУ-ын цомог (2х Multiplex PCR kit, Zanasrex) ашиглан микросателлитын 3 маркераар мултиплекс ПГУ хийв. Генетикийн олон янз байдлыг тодорхойлоход ихэвчлэн олон аллельтай микросателлитын локусыг маркер болгон ашигладаг. Иймд бид уулын туурайтны стандарт праймеруудаас [15] өндөр полиморф чанартай буюу 8-аас дээш аллельтай INRA040, BM302, BM4505 локусыг төлөөлөл болгон судалгаандаа сонгон ашиглав [15]. Праймерууд хоорондоо димер үүсгэх эсэхийг Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific) программыг ашиглан тооцов. Бөөмийн микросателлитын дараах 3 өөр флуоресценц өнгөтэй (FAM, HEX, TAM-RA) бодисоор тэмдэглэсэн праймерыг ашиглав: 5'FAM-INRA040 (цэнхэр) F: TCA GTC TCC AGG AGA GAA AAC; INRA040 R:CTC TGC CCT GGG GAT GAT TG; 5'HEX-BM302 (ногоон) F: GAA TTC CCA TCA CTC TCT CAG C; BM302 R:GTT CTC CAT TGA ACC AAC TTC A; 5'-TAMRA BM4505 (улаан) F: TTA TCT TGG CTT CTG GGT GC; BM4505 R: ATC TTC ACT TGG GAT GCA GG. ПГУ-ыг Маудет нарын арга зүйн дагуу touchdown ПГУ буюу праймерийн холбогдох температурыг эхний 10 циклд 55°C-аас 45°C хүртэл цикл бүрд 1°C-аар буурахаар, үлдсэн 25 циклд 45°C байхаар тохируулан явуулав [15].

Полиакриламидын гель электрофореграмм (ПААГ)

Мултиплекс ПГУ амжилттай явагдсан эсэхийг шалган мултиплекс ПГУ-ын бүтээгдэхүүнээс 10 мкл-ийг 10%-ийн полиакриламидын гельд 100 В-д 1.5 цаг гүйлгэв. Полиакриламидын гельд 10% Акриламид:Бизакриламидын (29:1), 1х TBE, 0.07% APS, 0.08% TEMED байхаар тооцон найруулав.

Гелийг гүйж дууссаны дараа микросателлитын аллелийг ажиглахын тулд мөнгөний нитратаар будав. Үүнд, 1% HNO₃-д 10 минут, 0.1% AgNO₃-д 20 минут, 3% Na₂CO₃-д ДНХ-ийн зурвас үзэгдэх хүртэл тус тус эгсрэгчтэй будсан бөгөөд 3% Na₂CO₃-аар будагдахдаа формальдегид ашиглав. Будалт бүрийн дараа нэрсэн усаар зайлж будагдсан гелийн зургийг гель документацийн аппарат (Bio-Rad) дээр авав.

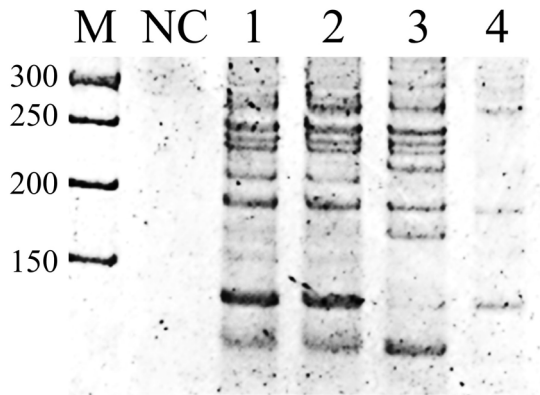
Фрагмент анализ

Амжилттай явагдсан мултиплекс ПГУ-ийн бүтээгдэхүүнийг БНСУ-ын MacroGen компани руу явуулан аллелийн уртыг уншуулав. Бөөмийн микросателлитын BM302, INRA040, BM4505 локус дахь аллелийн уртыг Peak Scanner 2.0 (ThermoFisher) программ ашиглан, ДНХ стандарт маркерын үүсгэсэн урттай харьцуулан тогтоов. Тогтоосон аллелиудын урт нь аргаль хонины популяцын судалгаанд ашиглах боломжтой эсэхийг шалган популяцын генетикийн ерөнхий генетик үзүүлэлтүүд болох популяц тус бүрийн локус бүр дэх аллелийн тоо (Na), эффектив аллель (Ne), шайнон индекс (I), ажиглагдсан гетерозигот (Ho), онолын гетерозигот байдлыг (He) GeneAlex v6 программ ашиглан тооцов.

Судалгааны үр дүн

Монгол орны Аргаль хонины Алтай, Говь, Хангай, Хорьдол Сарьдагийн популяцын олон янз байдлын судалгааг микросателлитын локус дахь аллелийн уртыг Генетик Аналайзер төхөөрөмжид уншуулж өндөр нарийвчлалтай тодорхойлдог дэлхийн жишигт нийцсэн аргаар хийхийг зорив. Судалгаанд ашигласан микросателлитын BM302, INRA040, BM4505 маркерийн праймеруудыг Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific) программыг ашиглан тооцоход хоорондоо димер үүсгээгүй тул цаг хэмнэх үүднээс мултиплекс ПГУ-ын нөхцөлийг тохируулан боловсруулж, локусууд дахь аллелиуд амжилттай олширсон эсэхийг урьдчилсан байдлаар 10% ПААГ гүйлгэн мөнгөний нитратаар будан шалгахад амжилттай олширсон байв (**1-р зураг**). Популяц тус бүрээс 1,1 дээжийн дүнг 1-р зурагт харуулав.

Мултиплекс ПГУ амжилттай явагдсан аргаль



1-р зураг. Аргаль хонины популяц тус бүрт микросателлитын BM302, INRA040, BM4505 локусуудын мультиплекс ПГУ-ын жишээ бүтээгдэхүүн ПААГ электрофореграммд харагдах байдал: M = маркер, NC = сөрөг хяналт, 1) Алтай, 2) Говь, 3) Хангай, 4) Хорьдол Сарьдаг

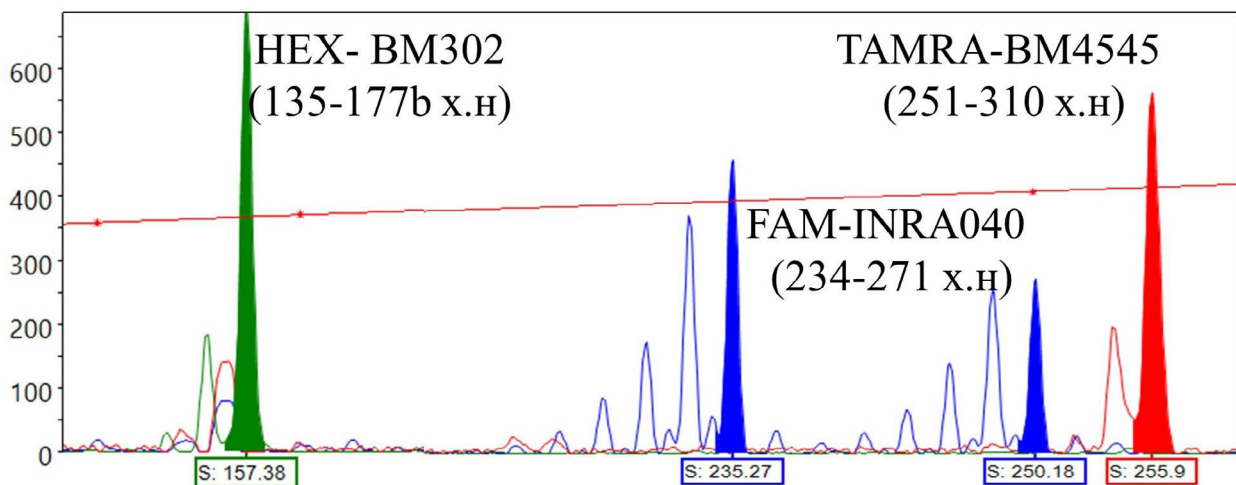
хонины нийт 99 дээжинд BM302, INRA040, BM4505 локусуудын мультиплекс ПГУ хийн тэдгээрийн уртыг тогтоолгохоор Макрожен компанид илгээн уншуулав. Уншилтын хариуг Peak Scanner 2.0 (ThermoFisher) программаар харахад Маудет нарын тэмдэглэсэн уртад [15] BM302, INRA040, BM4505 локус тус бүрээс 1 эсвэл 2 аллель илрэв (**2-р зураг**).

Аргаль хонины нийт 99 дээжийн BM302, INRA040, BM4505 локус дахь аллелиудын уртыг Peak Scanner программаас нэг бүрчлэн бүртгэн авч боловсруулаад генетик үзүүлэлтүүдийг тооцоход 3 локуст ажиглагдсан аллелийн тоо (Na) аргаль

хонины Алтай, Говь, Хангайн популяцуудад дунджаар 15.00, 16.67, 13.33 аллель тус, тус илэрсэн бол Хорьдол Сарьдагийн популяцад 9.00 аллель илэрсэн. Алтай, Говь, Хангайн популяцуудын эффектив буюу ашигтай аллелийн тоо (N_e) 6.73, 8.02, 9.94, ажиглагдсан гетерозигот байдал (H_o) нь 0.80, 0.74, 0.86 байсан бол Хорьдол Сарьдагийн популяцад $N_e=4.20$, $H_o=0.64$ байв (**2-р хүснэгт**).

Хэлэлцүүлэг

Популяцын генетикийн судалгаанд микросателлитын маркер ашиглахдаа микросателлитын локусын хэсгийг ПГУ-ын аргаар олшруулан үүссэн бүтээгдэхүүний уртын ялгаатай байдал дээр анализ хийдэг. ПГУ-ын бүтээгдэхүүний уртын ялгааг илрүүлэх хамгийн энгийн арга бол ПААГ-д гүйлгээд будаж харах арга юм. ПААГ нь 200 х.н-аас богино урттай, тетрануклеотидаас дээш олигонуклеотидийн давтагдсан микросателлитын аллелиудын уртыг ялган тогтооход тохиромжтой байдаг [16] бол фрагмент анализ нь 0.5 х.н-ийн ялгааг илрүүлэх боломжтой [16], [17]. ПААГ-ийн арга зүйг ашиглан хийсэн бидний өмнөх судалгаагаар Алтай болон Говийн популяцад тус бүр BM302 локусын 3 буюу цөөн тооны аллель [2] илэрч байсан бол энэхүү судалгаанд Алтайн популяцад 12, Говийн популяцад 17 аллель илрэв. Иймээс ПААГ арга зүйг ашиглахад ди-, тринуклеотидийн



2-р зураг. Peak Scanner 2.0 (ThermoFisher) программ дээр HEX-BM32 (ногоон), FAM-INRA040 (цэнхэр), TAMRA-BM4505 (улаан) локусуудын аллелиуд харагдах байдал. Босоо тэнхлэгийн дагуу бүтээгдэхүүний өндөр, хэвтээ тэнхлэгийн дагуу бүтээгдэхүүний урт (bp)-ийг харуулав. Энэхүү дээжид BM32 локуст 157 bp урттай аллель, INRA040 локуст 235 bp, 250 bp урттай аллель, BM4505 локуст 256 bp урттай аллель илрэв.

2-р хүснэгт. Аргаль хонины Алтай, Говь, Хангай, Хорьдол Сарьдагийн популяцуудын 3 микросателлит локус дахь генетик үзүүлэлт.

Популяц	Локус	Na	Ne	Ho	He
Алтай (n=31)	INRA040	16.000	7.392	0.935	0.865
	BM302	12.000	4.609	0.677	0.783
	BM4505	17.000	8.214	0.806	0.878
	Дундаж	15.000	6.738	0.806	0.842
Говь (n=30)	INRA040	16.000	6.642	0.867	0.849
	BM302	17.000	8.955	0.733	0.888
	BM4505	17.000	8.491	0.633	0.882
	Дундаж	16.667	8.029	0.744	0.873
Хангай (n=23)	INRA040	14.000	9.981	0.913	0.900
	BM302	11.000	6.782	0.783	0.853
	BM4505	15.000	13.062	0.870	0.923
	Дундаж	13.333	9.942	0.855	0.892
Хорьдол Сарьдаг (n=15)	INRA040	11.000	3.913	0.600	0.744
	BM302	9.000	5.921	0.733	0.831
	BM4505	7.000	2.778	0.600	0.640
	Дундаж	9.000	4.204	0.644	0.739

Na = ажиглагдсан аллелийн тоо, Ne = Эффектив аллелийн тоо, Ho = Ажиглагдсан гетерозигот, He = онолын гетерозигот

ялгаатай аллелиудыг гель дээр харагдах байдлаар нь ялгах боломжгүйн улмаас аллелийн тоо тойм байдлаар цөөн илэрчээ. Тиймээс энэ судалгаанд илүү нарийвчилж, аллелиудын тоог үнэн зөв гаргахын тулд фрагмент анализын аргыг тогтворжуулан хийсэн.

Түүнчлэн аливаа популяцын генетик тогтцыг бүрэн тодорхойлохын тулд 8 эсвэл түүнээс олон микрсателлитын маркер ашиглан генетик судалгаа явуулах шаардлагатай байдаг. Олон дээж дээр микрсателлитын маркер тус бүрийг ПГУ-аар олшруулахад маш их хугацаа зарцуулдаг. Мультиплекс ПГУ-ын арга зүйг ашиглан хэдий чинээ олон маркераар нэгэн зэрэг ПГУ явуулна төдий чинээ цаг хугацаа, бодис урвалж хэмнэх боломжтой [13]. Иймд манай лаборатори мультиплекс ПГУ-ын арга зүйг тогтворжуулан боловсруулж, энэ судалгаанд микрсателлитын BM302, INRA040, BM4505 маркеруудыг нэгтгэн мультиплекс ПГУ хийсэн нь амжилттай боллоо (**1-р зураг**). Энэхүү мультиплекс ПГУ-ын бүтээгдэхүүнүүдэд фрагмент анализ хийлгэхэд BM302, INRA040, BM4505 локус тус бүрт Маудет [15] нарын тэмдэглэсний дагуу 135-177 х.н, 234-271 х.н, 251-310 х.н урттай аллелиуд тус тус зөв уртад илрэв.

Энэхүү мультиплекс ПГУ ба фрагмент анализийн

арга зүйгээр илрүүлсэн аллелийн мэдээллийг боловсруулан Монгол оронд аргаль хонины Алтай, Говийн, Хангайн, Хорьдол Сарьдагийн популяцын судалгаанд ашиглах боломжтой эсэхийг шалган BM302, INRA040, BM4505 локус дахь ажиглагдсан аллелийн тоо (Na), эффектив аллелийн тоо (Ne), ажиглагдсан гетерозигот байдал (Ho) болон хүлээгдэж буй гетерозигот байдал (He)-ыг тооцсон (**2-р хүснэгт**).

Na нь тухайн популяцад одоо байгаа аллелийн тоог харуулдаг. Алтайн, Говийн, Хангайн популяцуудын Na (15.00, 16.67, 13.33) нь Хорьдол Сарьдагийн популяцын Na (9.00)-аас их байгаа нь Хорьдол Сарьдагийн популяц нь цөөн бодгальтай тусгаарлагдсан популяц, мөн дээжийн тоо хангалтгүйгээс шалтгаалсан байж болох юм. Учир нь Манай лаборатори болон Улаан тайгын УТХГ-ын захиргааны хамтарсан тооллогоор Хорьдол Сарьдагийн популяцад 2009 онд 32 толгой аргаль хонь, 2017 онд 59 толгой аргаль хонь тус тус бүртгэгдсэн [7], [18].

Нень тухайн популяцын хүлээгдэж буй гетерозигот байдлын тоон утгыг гаргах тухайн локус дахь ижил давтамжтай аллелийн тоог хэлдэг. Алтайн, Говийн популяцын Ne (6.73, 8.02) нь Na (15.00, 16.67)-аас хэт бага байгаа нь тухайн популяцад илэрсэн ихэнх аллель нь бага давтамжтай байгааг харуулж байна. Энэ нь тус популяцуудын ихэнх бодгаль нь популяцад давамгайлсан их давтамжтай аллелиудыг агуулж цөөн бодгаль нь өвөрмөц аллелиудыг агуулж байгааг илтгэж байна [19]. Энэхүү бага давтамжтай өвөрмөц аллель нь популяцын удмын сангаас устах өндөр магадлалтай байдаг [20]. Энэ нь Хорьдол Сарьдагийн популяцад ч мөн ажиглагдаж байна (Na=9.00, Ne=4.2). Хангайн популяцын хувьд аллелийн давтамж бусад популяцуудтай харьцуулахад харьцангуй жигд байна (Na=13.33, Ne=9.94).

Популяцын гетерозигот бодгалийн хэмжээг Ho, генийн олон янз байдлыг He хэмждэг. Популяц дахь гетерозигот бодгаль их байх тусам популяцын инбридингийн дарамтад өртөх магадлал буурдаг [12]. Алтай, Говь, Хангайн популяцуудын Ho нь өндөр (0.80, 0.74, 0.86) байгаагаас харахад тус популяцуудын дийлэнх нь гетерозигот бодгаль ихтэй байна. Мөн бүх популяцын He өндөр (0.84, 0.87, 0.89, 0.73) байгаа нь генийн олон янз байдал

өндөр байгааг харуулж байна. Na, Ho, He-ийн утга өндөр популяцуудын генетик олон янз байдал их байна гэж үзэж болох ч Ne-ийн утга бага байгаа нь энэхүү генетик олон янз байдлын ихэнх хувилбарууд нь популяцад маш бага давтамжтайгаар тохиолдож байгааг харуулж байна. Эдгээр хувилбаруудыг цаашид популяцад хадгалж үлдээн давтамжийг нь нэмэгдүүлснээр аргаль хонины генетик олон янз байдал хадгалагдах боломжтой юм [21].

Дүгнэлт

Монгол орны аргаль хонины популяцын судалгаанд микросателлитын BM302, INRA040, BM4505 маркеруудаар төлөөлүүлэн мультиплекс ПГУ-ын нөхцлийг тогтворжуулж, фрагмент анализын арга зүйг лабораторидоо нутагшуулан ашиглахад тус локусууд дахь аллелиудыг үнэн зөв олшруулан, илэрсэн аллелиудын уртыг богино хугацаанд өндөр нарийвчлалтайгаар тогтоов. Түүнчлэн фрагментүүдийн уртад боловсруулалт хийхэд аргаль хонины Алтай, Говь, Хангай, Хорьдол Сарьдагийн популяцуудын генетик олон янз байдал нь өндөр ч ихэнх аллелиуд нь бага давтамжтай байгааг урьдчилсан дүнг гаргав. Цаашид аргаль хонины ангилал зүй, хамгаалалд ач холбогдол бүхий илүү үнэн зөв мэдээлэл авахын тулд энэ туршсан аргазүйн дагуу судалгааны маркерийн тоог нэмэгдүүлэн судлах шаардлагатай гэж дүгнэв.

Талархал

Энэхүү судалгааг санхүүжүүлсэн Шинжлэх ухаан технологийн сан (ШуСС-2020/22) болон судалгааны ажлын дээж материалыг цуглуулахад гүн туслалцаа үзүүлсэн Отгон тэнгэрийн УТХГ -ын байгаль хамгаалагч Ч.Бат-өлзий, Ш.Энхбуянт болон Их газрын чулууны БЦГ-ын байгаль хамгаалагч Д.Мөнх-Очир, Х.Эрдэнэбат, О.Эрдэнэ нарт чин сэтгэлийн талархал илэрхийлье.

Ашигласан бүтээл

- [1] “*Ovis ammon* - an overview | ScienceDirect Topics.” <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/ovis-ammon> (accessed Feb. 10, 2022).
- [2] B. Delgerzul, Z. Unudbayasgalan, T. Bilguun, C. Battsetseg, B. Galbadrahk, and B. Tserendulam, “Genetic comparison of Altai and Gobi argali sheep (*Ovis ammon*) populations using mitochondrial and microsatellite markers: Implication on conservation,” *Proc. Mong. Acad. Sci.*, pp. 54–61, Dec. 2019, <https://doi.org/10.5564/pmas.v59i3.1247>
- [3] J. Feng, M. R. Frisina, M. S. Webster, and G. Ulziima, “Genetic Differentiation of Argali Sheep *Ovis Ammon* in Mongolia Revealed by Mitochondrial Control Region and Nuclear Microsatellites Analyses,” *J. Bombay Nat. Hist. Soc.*, vol. 106, pp. 38–44, 2009.
- [4] “The IUCN Red List of Threatened Species,” IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/en> (accessed Feb. 10, 2022).
- [5] T. Tserenbataa, R. R. Ramey, O. A. Ryder, T. W. Quinn, and R. P. Reading, “A population genetic comparison of Argali Sheep (*Ovis ammon*) in Mongolia using the ND5 gene of mitochondrial DNA; implications for conservation,” *Mol. Ecol.*, vol. 13, no. 5, May 2004, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02123.x>
- [6] Ж. Төмөрсүх, “Хөвсгөлийн ховор болон ховордсон агнуурын хөхтөн амьтдын судалгаа,” Мөрөн, Хөвсгөл, Монгол Улс, тайлан, 1994.
- [7] Ч. Батцэцэг, З. Өнөдбаясгалан, Ж. Төмөрсүх, and Т. Хорлоожав, “Хорьдол Сарьдагийн аргаль хонь (*Ovis ammon*) -ны тоо толгой, тархац байршлын өнөөгийн төлөв (2017 оны байдлаар).,” *Биологийн хүрээлэнгийн бүтээл*, pp. 12–13, 2018.
- [8] G. Wingard, “Dietary overlap between argali sheep and domestic livestock in Mongolia,” *Grad. Stud. Theses Diss. Prof. Pap.*, Jan. 2005, [Online]. Available: <https://scholarworks.umt.edu/etd/6496>
- [9] Zahler *et al.*, “Illegal and Unsustainable Wildlife Hunting and Trade in Mongolia,” *Mong. J. Biol. Sci.*, vol. 2, no. 2, 23-31, 2004, <https://doi.org/10.22353/mjbs.2004.02.14>
- [10] S. J. O’Brien, “A role for molecular genetics in biological conservation.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 13, pp. 5748–5755, Jun. 1994, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.5748>
- [11] K. A. Selkoe and R. J. Toonen, “Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite

- markers,” *Ecol. Lett.*, vol. 9, no. 5, pp. 615–629, May 2006, <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>.
- [12] K. S. Kim and T. W. Sappington, “Microsatellite Data Analysis for Population Genetics,” in *Microsatellites*, vol. 1006, S. K. Kantartzi, Ed. Totowa, NJ: *Humana Press*, 2013, pp. 271–295. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_19.
- [13] D. Sint, L. Raso, and M. Traugott, “Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success,” *Methods Ecol. Evol.*, vol. 3, no. 5, pp. 898–905, Oct. 2012, <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x>.
- [14] Өнөдбаясгалан З., Билгүүн Ц., and Цэрэндулам Б., “ДНХ –ийг давсаар угаах уламжлалт арга зүйд үндэслэн хорголоос ДНХ ялгах шинэ арга туршсан дүнгээс,” *Биологийн хүрээлэнгийн бүтээл*, vol. 34, pp. 203–209, 2018.
- [15] C. Maudet *et al.*, “A standard set of polymorphic microsatellites for threatened mountain ungulates (Caprini, Artiodactyla): PRIMER NOTE,” *Mol. Ecol. Notes*, vol. 4, no. 1, pp. 49–55, Mar. 2004, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00563.x>.
- [16] A. Karp, P. G. Isaac, and D. S. Ingram, Eds., *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*, 1. ed. London Weinheim: Chapman & Hall, 1998.
- [17] N. Mittal and A. Dubey, “Microsatellite markers - A new practice of DNA based markers in molecular genetics,” *Pharmacogn. Rev.*, vol. 3, pp. 235–246, Jul. 2009.
- [18] Ч. Батцэцэг, Т. Одбаяр, Ж. Төмөрсүх, and Х. Түмэннасан, “Хорьдол Сарьдагийн нурууны аргаль хонь (*Ovis ammon*) -ны тоо толгой, тархац байршлын өнөөгийн төлөв байдал,” *Биологийн хүрээлэнгийн бүтээл*, vol. 28, pp. 12–13, 2011.
- [19] BS Weir, “Intraspecific differentiation,” in *Molecular systematic*, DM Hillis and C Moritz, Eds. Sinauer Associates, 1990, pp. 124–125.
- [20] M. V. Trotter and H. G. Spencer, “The generation and maintenance of genetic variation by frequency-dependent selection: constructing polymorphisms under the pairwise interaction model,” *Genetics*, vol. 180, no. 3, pp. 1547–1557, Nov. 2008, <https://doi.org/10.1534/genetics.108.088880>
- [21] R. R. Hudson, “Statistics in Genetics: Genetic Data Analysis. Methods for Discrete Population Genetic Data. Bruce S. Weir. Sinauer, Sunderland, MA” *Science*, vol. 250, no. 4980, pp. 575–575, Oct. 1990, <https://doi.org/10.1126/science.250.4980.575>