



Генетична структура української популяції водяних буйволів за ISSR-PCR маркерами

Н. Б. Мохначова

nataliia.mokhnachova82@gmail.com

Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН,
вул. Погребняка, 1, с. Чубинське, Бориспільський р-н, Київська обл., 08321, Україна

Вивчення внутрішньовидової генетичної різноманітності великої рогатої худоби, зокрема і видів роду *Bubalus* із підродини Бикові, має важливе значення через скорочення біорізноманітності сільськогосподарських тварин. Основою генетичної різноманітності є її генетична складова. Втрата місцевих видів та порід великої рогатої худоби — реальна загроза для біосфери, бо стійкість відтворення природних екосистем і агроекосистем безпосередньо пов'язана з їхньою генетичною здатністю пристосовуватися до умов зовнішнього середовища. Проаналізовано поліморфізм ISSR-маркерів української популяції водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) з господарства ТОВ «ТАСБІО» (Чернігівська обл.). Для дослідження було відібрано 66 тварин. Зразки геномної ДНК виділено з венозної крові за допомогою стандартного набору реагентів «ДНК-сорб-В». Генотипування проводили з використанням специфічних ISSR-праймерів: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG і (GA)₆CC. Кожен амплікон розглядали як один локус ДНК. Різницю спектрів визначали як за кількістю ампліконів, їх довжинами (кількість нуклеотидів), так і за їх поліморфізмом. У результаті дослідження всі праймери показали поліморфізм ділянок ДНК буйволів. Амплікони визначали в діапазоні від 200 до 4000 п.н. Аналіз ISSR-спектрів виявив 87 локусів, з яких 71 поліморфний. (AG)₈CA-маркер виявився найменш поліморфним (PIC=0,234), а (CTC)₆C — найбільш поліморфним (PIC=0,389). Консервативні локуси знайдено у чотирьох ISSR-маркерів: шість — у (AG)₈CA-маркера, п'ять — у (AG)₈CG, чотири — у (GA)₆CC та один — у (AG)₉C. Для української популяції водяних буйволів виявлено 67 видоспецифічних локусів: 10 — для (AG)₉C, три — для (ACC)₆G, чотири — для (GAG)₆C, сім — для (CTC)₆C, 15 — для (AG)₈CA і по 14 — у (AG)₈CG і (GA)₆CC. Використані ISSR-праймери рекомендовані для молекулярно-генетичного аналізу поліморфізму ДНК буйволів.

Ключові слова: буйволи, генетична структура, ДНК, поліморфізм, маркери, ISSR, локуси, молекулярно-генетичний аналіз

Моніторинг генетичного поліморфізму популяцій є надважливим для збереження та відтворення сільськогосподарських тварин, оскільки за інформацією ФАО в середньому за місяць людство втрачає одну породу. Під загрозою зникнення опинились місцеві породи сільськогосподарських видів тварин, які мають у своєму геномі рідкісні алелі, асоційовані з пристосуванням до умов навколишнього середовища [4]. Скорочення біорізноманітності сільськогосподарських тварин відбувається через неконтрольовану заміну місцевих порід невеликою кількістю транснаціональних [12]. Основною причиною збереження місцевих порід є унікальність їх генетичної структури [5]. Тому необхідною умовою для запобі-

гання втрати генетичної різноманітності є проведення генетичного моніторингу сільськогосподарських видів на молекулярному рівні.

Вивчення генетичної структури відбувається переважно за мікросателітними локусами та QTL-маркерами [5]. Проте одним зі зручних методів вирішення цієї проблеми є ампліфікація міжмікросателітних фрагментів ДНК, розташованих між двома інвертованими SSR-локусами геному (ISSR-PCR). Цей метод почав розвиватися у 1994 р. і отримав широке розповсюдження в наш час [13]. Як праймери для ISSR-аналізу поліморфізму ДНК використовують короткі ди- і тринуклеотидні мікросателітні повтори. Такі праймери дозволяють ампліфікувати фрагменти

ДНК, розміщені між двома близько розташованими інвертованими мікросателітами (переважно це унікальна ДНК). У результаті ампліфікується велика кількість фрагментів, які виявляються на електрофореграмі дискретними смужками (ISSR-фінгерпринтинг). Отримані патерни ПЛР-продуктів видоспецифічні і належать до маркерів домінантного типу успадкування, поліморфізм яких визначається за наявністю чи відсутністю смужки. Для створення ISSR-маркерів не потрібне знання нуклеотидної послідовності досліджуваної ДНК. У геномах тварин є велика кількість мікросателітних повторів, що робить цей метод зручним для генетичного аналізу [2, 8]. Також метод ISSR-аналізу гарно відтворюється і може бути використаний для визначення міжвидової та внутрішньовидової генетичної мінливості, ідентифікації груп рослин і тварин різного таксономічного рангу, а інколи й для індивідуального генотипування [1, 3, 9, 10].

За кордоном із використанням молекулярних методів аналізу досліджують переважно європейські види тварин. Більша частина місцевих аборигенних порід і видів на молекулярно-генетичному рівні практично не досліджена. Серед них — і українська популяція водяних буйволів.

В Україні буйволівництво — давня традиційна галузь тваринництва кримських татар та русинів Закарпаття. Переважно «українські» буйволи належать до буйвола річкового (*river buffalo*), розводять їх молочного та м'ясного напрямку продуктивності. Буйволи — древні тварини, які належать до роду биків (*Bos*), виокремлені у самостійний рід буйволів (*Bubalus*) та розділені на три окремих роди: аноа, азійські та африканські буйволи. Одомашнені форми буйволів належать до азійських. Останнім часом за кордоном стали присвячувати більше уваги цим тваринам. Це особливо помітно у таких країнах, як Індія, Єгипет та Італія. В Україні ж існує екологічна ініціатива «Збереження агробіорізноманіття Карпатських гір», спрямована на відновлення популяції карпатських буйволів [6, 7].

Метою цього дослідження є аналіз поліморфізму ISSR-маркерів і генетичного різноманіття української популяції водяних буйволів.

Матеріали і методи

Було досліджено зразки венозної крові ($n=66$) від водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) з господарства ТОВ «ТАСБІО», Чернігівська обл. (рис. 1). Товариство спеціалізується на розведенні буйволів і виготовленні продуктів харчування з молока буйволиць.

Молекулярно-генетичні дослідження проводили на базі лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН. Геномну ДНК з цільної крові виділяли із використанням стандартного комерційного набору «ДНК-сорб-В» (виробництво АмпліСенс, ЦНІІ епідеміології МЗ РФ,



Рис. 1. Фото водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) ТОВ «ТАСБІО» (Чернігівська обл.)

Fig. 1. Photo of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) TASBIO LLC (Chernihiv region)

РФ). Концентрацію отриманої ДНК в отриманому препараті визначали в агарозному гелі, порівнюючи яскравість смужок аналізованих фрагментів і стандартного препарату ДНК (фрагменти фага λ).

Суміш для проведення ПЛР містила: 2 мкл загального буфера для ДНК-полімерази, 1 мкл суміші трифосфатів (АмпліСенс, РФ), 0,8 мкл відповідного праймера, 0,2 мкл ДНК-полімерази (*Fermentas*, Литва). Геномну ДНК додавали у кількості 1,5, об'єм ДНК-суміші становив 10 мкл. Ампліфікацію сумарної ДНК з праймерами проводили на програмованому чотириканальному термоциклі «Терцик» (ДНК-технологія, РФ).

Дослідження поліморфізму фрагментів ДНК, фланкованих інвертованими повторами мікросателітних локусів (ISSR-PCR маркери), виконували стандартним методом [13]. Як праймери використовували мікросателітні послідовності: $(ACC)_6G$, $(GAG)_6C$, $(AG)_9C$, $(CTC)_6C$, $(AG)_8CA$, $(AG)_8CG$ і $(GA)_6CC$, які вважають найбільш інформативними (табл. 1).

Таблиця 1. Послідовності праймерів, використаних у дослідженні
Table 1. The primers sequences used in the study

Послідовність праймера Primer sequence	Мотив Motive	t випалу t of firing
5'-ACCACCACCACCACCACC-3'	$(ACC)_6G$	64°C
5'-GAGGAGGAGGAGGAGGAGC-3'	$(GAG)_6C$	64°C
5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	$(AG)_9C$	57°C
5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGCG-3'	$(AG)_8CG$	56°C
5'-GAGAGAGAGAGAGACC-3'	$(GA)_6CC$	54°C
5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTCC-3'	$(CTC)_6C$	64°C
5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCA-3'	$(AG)_8CA$	54°C

Фракціонування продуктів ампліфікації проводили в 2% агарозному гелі в 1×TBE-буфері за напруги 90 В (тривалість фореузу 2 год.). Для оцінки довжини продуктів ПЛР використовували ДНК-маркер молекулярних мас 1 Kb *Ready-to-Use* (Fermentas, Литва). Інтерпретацію продуктів ампліфікації здійснювали, фотографуючи гелі цифровою камерою під короткохвильовим ультрафіолетовим випромінюванням на транслюмінаторі після фарбування гелю бромистим етидієм.

Кожен амплікон розглядали як один локус ДНК. Параметри генетичного різноманіття визначали за допомогою комп'ютерної програми *Microsoft Excel*.

Результати й обговорення

Виконано аналіз генетичної структури водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) за використанням семи ISSR-систем на основі таких мікросателітів: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC (рис. 2).

У дослідженій популяції буйволів спектри продуктів ампліфікації за використання ISSR-праймерів (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC суттєво відрізнялися один від одного. Різницю спектрів визначали як за кількістю ампліконів, їх довжинами (кількість нуклеотидів), так і за поліморфізмом.

За допомогою мікросателітних праймерів (ACC)₆G, (GAG)₆C та (CTC)₆C було виявлено відповідно сім, п'ять та 10 локусів, які виявились поліморфними. Решта праймерів дали такі результати: за (AG)₉C

та (AG)₈CA — 15 та 20 локусів (по 14 поліморфних), за (AG)₈CG — 16 локусів (11 поліморфних) і (GA)₆CC дав 14 локусів, з яких поліморфними виявились 10 фрагментів. Амплікони виявлені в діапазоні від 200 до 4000 п.н. (табл. 2).

Частота фрагментів суттєво залежала від ISSR-праймера, який брав участь у полімеразній ланцюговій реакції. Так, у продуктах ампліфікації, отриманих за допомогою (AG)₈CA праймера, фрагмент 530–550 п.н. виявляли у всіх досліджених тварин. З високою частотою (0,8) цей амплікон виявлено за ампліфікації з (ACC)₆G та (GA)₆CC. За використання (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CG та (GA)₆CC цей фрагмент не трапляється. До ампліконів з найбільшою частотою належить також 380–400 п.н. Цей фрагмент є у всіх тварин за використання (AG)₈CG та (GA)₆CC. Значно рідше (0,1) він трапляється у (CTC)₆C (0,6), (ACC)₆G (0,5), (AG)₈CA. Поширеними також є фрагменти 520–500 та 870–820 п.н. У спектрах ампліфікації з (AG)₈CA ці амплікони є у всіх тварин. Також 100% тварин мали амплікон 520–500 п.н. за (AG)₉C і (AG)₈CG.

Для визначення генетичної різноманітності популяції водяних буйволів було використано методи оцінки на популяційному рівні. У табл. 3 наведено показники генетичної мінливості дослідженої популяції водяних буйволів (*Bubalus bubalis*) ТОВ «ТАСБІО» (n=66) за (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC.

Загалом за сімома праймерами у спектрах ампліфікації було отримано 87 локусів, з яких 71 виявився поліморфним. Загальна частка поліморфних локусів становила 81,6%, середнє значення індексу PIC за сімома праймерами — 0,321.

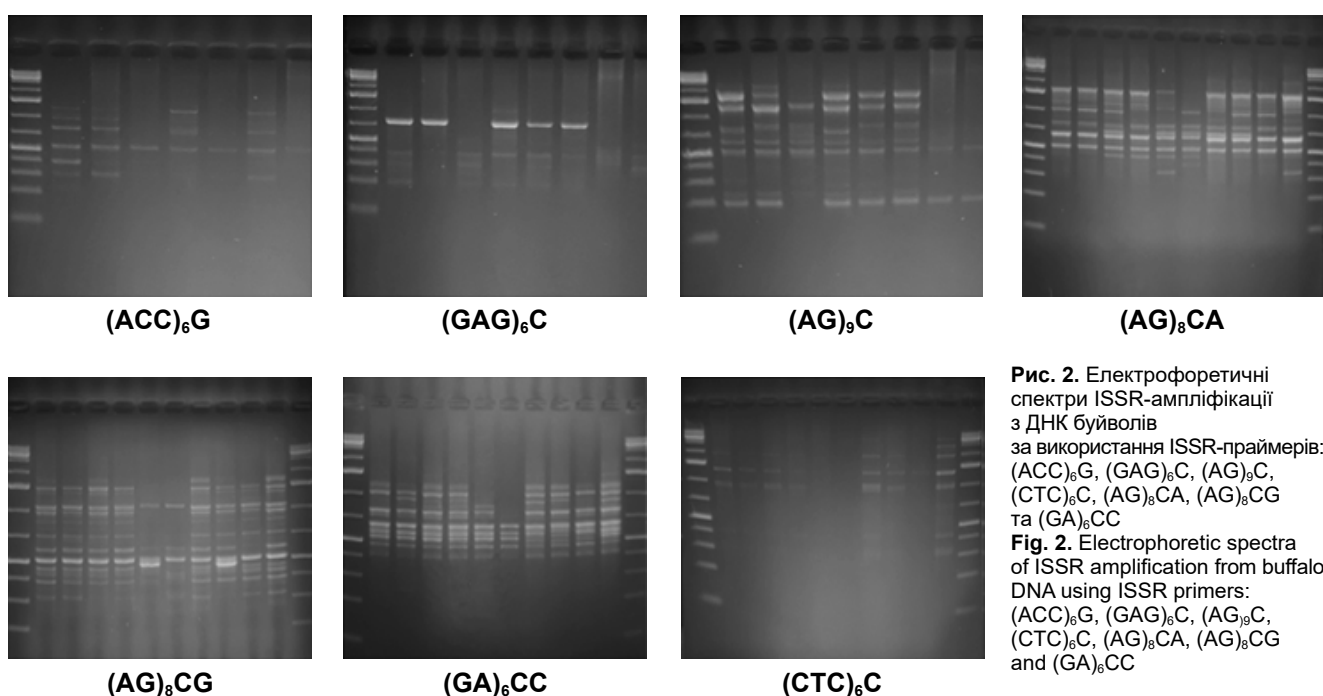


Рис. 2. Електрофоретичні спектри ISSR-ампліфікації з ДНК буйволів за використання ISSR-праймерів: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC
Fig. 2. Electrophoretic spectra of ISSR amplification from buffalo DNA using ISSR primers: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG and (GA)₆CC

Таблиця 2. Частоти фрагментів для ISSR-праймерів: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC для популяції водяних буйволів**Table 2.** Slice frequencies for ISSR-primers (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG and (GA)₆CC for the water buffalo population

Розміри фрагментів Fragments dimensions	(ACC) ₆ G	(GAG) ₆ C	(AG) ₉ C	(CTC) ₆ C	(AG) ₈ CA	(AG) ₈ CG	(GA) ₆ CC
3100–4000				0,20			
3000–2600				0,10			
2500–2300					0,10		
2100–2000			0,30	0,70			
1900–1800			0,10				
1750–1700						0,70	
1650–1600			0,50				
1550–1500			0,60		0,90	0,80	
1450–1400					0,90	0,80	0,40
1350–1300	0,30				0,90		
1290–1240			0,60	0,80			0,80
1230–1180					0,80		0,80
1170–1120			0,60				
1110–1060					1,00	1,00	
1050–1000		0,10		0,70	0,60	0,80	0,90
990–940	0,20			0,70	0,20		
930–880						0,80	0,50
870–820			0,40	0,10	1,00		0,50
810–760	0,40		0,40		0,80		0,90
750–720		0,50	0,20		0,50		0,90
710–680					1,00	0,80	
670–640					0,90	0,20	1,00
630–600			0,70			0,90	
590–560							1,00
550–530	0,80				1,00		0,80
520–500			1,00		1,00	1,00	0,70
490–470			0,30		1,00	0,90	1,00
460–440					0,50		
430–410				0,60	0,10	1,00	
400–380	0,50			0,60	0,10	1,00	1,00
370–360		0,80					
350–340						0,30	
330–320				0,70	0,20	1,00	
310–300	0,30		0,50	0,70			
290–280		0,50				0,40	
270–260							
250–240	0,10						
230–220			0,60				
210–200		0,50	0,80				
180–160							

Таблиця 3. Популяційно-генетична характеристика буйволів української популяції з використанням ISSR-праймерів: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC**Table 3.** Population-genetic characteristics of water buffaloes of the Ukrainian population using ISSR-primers: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG and (GA)₆CC

ISSR-система ISSR system	n	Локусів / Loci		H _e	N _a	I	PIC	K
		виявлених detected	% поліморфних % polymorphic					
(ACC) ₆ G	66	7	100	0,817	0,371	0,309	0,299	—
(GAG) ₆ C	66	5	100	0,720	0,48	0,290	0,367	—
(AG) ₉ C	66	15	93,33	0,692	0,507	0,290	0,347	1
(CTC) ₆ C	66	10	100	0,648	0,536	0,256	0,389	—
(AG) ₈ CA	66	20	70	0,425	0,675	0,153	0,234	6
(AG) ₈ CG	66	16	68,75	0,337	0,775	0,149	0,290	5
(GA) ₆ CC	66	14	71,43	0,321	0,800	0,152	0,318	4

Примітка. H_e — очікувана гетерозиготність, N_a — середня кількість алелів на локус, I — індекс гетерогенності Шеннона, PIC — індекс поліморфізму локусу, K — кількість консервативних локусів

Note. H_e — expected heterozygosity, N_a — average number of alleles per locus, I — Shannon heterogeneity index, PIC — locus polymorphism index, K — number of conservative loci

Найменш поліморфним був (AG)₈CA-маркер — індекс поліморфності за ним становив 0,234. Саме за цим праймером було виявлено найбільшу кількість (K=6) консервативних локусів, які перебували в межах 470–490, 500–520, 530–550, 680–710, 820–870, 1060–1110 п.н. Загалом консервативні локуси знайдено ще в трьох ISSR-маркерів: п'ять — у (AG)₈CG, чотири — у (GA)₆CC та один — у (AG)₉C.

Разом із загальними локусами, в нашому дослідженні виявлені і видоспецифічні фрагменти. Для визначення видоспецифічного патерну в одомашнених видів було запропоновано використовувати лише фрагменти, які трапляються з частотою >0,4 [11]. Тому для української популяції водяних буйволів виявлено 10 видоспецифічних локусів для (AG)₉C, три — для (ACC)₆G, чотири — для (GAG)₆C, сім — для (CTC)₆C, 15 для (AG)₈CA, та по 14 у (AG)₈CG і (GA)₆CC (рис. 3).

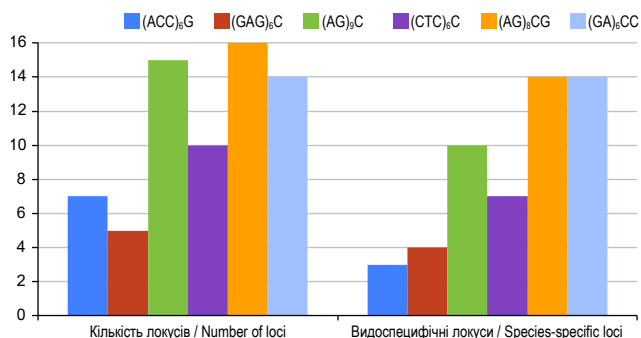


Рис. 3. Розподіл ISSR-фрагментів за вивченими праймерами української популяції водяних буйволів
Fig. 3. Distribution of ISSR fragments according to the studied primers of the Ukrainian water buffalo population

Висновки

1. Використання ISSR-систем досить вагомо збільшує можливості генетичного аналізу популяцій та дозволяє встановити внутрішньопопуляційну мінливість окремих ділянок геному.

2. ISSR-системи (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG та (GA)₆CC виявили достатній рівень поліморфізму для вивчення внутрішньовидової мінливості української популяції водяних буйволів.

3. Загалом за сімома праймерами в спектрах ампліфікації було отримано 87 локусів, з яких 71 виявився поліморфним. Загальна частка поліморфних локусів становила 81,6%, середнє значення індексу PIC за сімома праймерами — 0,321.

4. Найменш поліморфним виявився (AG)₈CA-маркер (PIC=0,234), в (ACC)₆G були найвищі показники рівня гетерозиготності (0,817) та генетичної біорізноманітності (I=0,309).

5. Для української популяції водяних буйволів виявлено 10 породоспецифічних локусів для (AG)₉C, три — для (ACC)₆G, чотири — для (GAG)₆C, сім — для (CTC)₆C, 15 — для (AG)₈CA і по 14 — у (AG)₈CG і (GA)₆CC.

Перспективи подальших досліджень

Заплановано дослідити аналіз каріотипу української популяції водяних буйволів з господарства ТОВ «ТАСБІО» (Чернігівська обл.) та дослідження генів, асоційованих з господарсько-корисними ознаками.

1. Bakkappa S, Talebi E, Subramanya G. Role of molecular markers (RAPD and ISSR) in silkworm conservation. *Intern. J. Adv. Biol. Res.* 2011; 1 (1): 1–7. Available at: [http://www.scienceandnature.org/IJABR/IJABR_Vol1\(1\)2011/IJABR_V1\(1\)1.pdf](http://www.scienceandnature.org/IJABR/IJABR_Vol1(1)2011/IJABR_V1(1)1.pdf)
2. Bekmanov BO, Amirgalieva AS, Mussayeva AS, Tulekei MD, Dosibayev KZ, Orasimbetova ZS, Khussainova EM, Zhabbasov RZ, Zhomartov AM. Molecular and genetic analysis of Edilbay sheep breeds. *News Nat. Acad. Sci. Rep. Kazakhstan.* 2015; 3 (309): 27–33. Available at: <http://biological-medical.kz/images/pdf/b20153/b2733.pdf>
3. Chen DX, Li LY, Zhang X, Wang Y, Zhang Z. Genetic diversity and population structure of wild *Dipsacus asperoides* in China as indicated by ISSR markers. *Genet. Mol. Res.*, 2014; 13 (3): 6340–6349. DOI: 10.4238/2014.February.14.12.
4. Glazko VI, Erkenov TA, Glazko TT, Dzatoev KM. Genetic structure of Karachai horses on ISSR-PCR markers. *Biogeosys. Tech.* 2016; 9 (3): 195–204. DOI: 10.13187/bgt.2016.9.195.
5. Golik TV, Erkenov TF, Glazko TT, Glazko VI. Spectra of ISSR-PCR markers in the evaluation of population-genetic differentiation of the Karachai horse on farms of the Karachai-Cherkess republic. *Mess. TSKHA*, 2018; 3: 61–77. DOI: 10.26897/0021-342X-2018-3-61-77.
6. Guseev YV, Melnyk OV, Gladyr EA, Zinovieva NA. The polymorphism of the population of the Ukrainian river buffalo at micro-satellite DNA loci. *Anim. Breed. Genet.* 2016; 51: 276–283. DOI: 10.31073/abg.51.37. (in Ukrainian)
7. Mokhnachova NB. Genotyping of Ukrainian water buffaloes according β -CN (A2-milk), CSN3 and β LG genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus. Agr. Ser.* 2021; 59 (3): 361–365. DOI: 10.29235/1817-7204-2021-59-3-361-365.
8. Nechaeva YS, Boronnikova SV, Yusupov RR, Heinze B. The study of ISSR-markers polymorphism in natural and cultural populations of larch. *Fund. Res.* 2013; 6 (6): 1426–1431. Available at: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31753>
9. Pashaei S, Azari MA, Hasani S, Khanahmadi A, Rostamzadeh J. Genetic diversity in Mazandaranian native cattle: comparison with Holstein cattle using the ISSR marker. *Pakistan J. Biol. Sci.* 2009; 12 (9): 717–721. DOI: 10.3923/pjbs.2009.717.721.
10. Sheikina OV, Prokhorova AA, Novikov PS, Krivorotova TN. Developing of the methodology for the identification of *Picea abies* L. clones by using ISSR markers. *Sci. J. KubGAU*, 2012; 83 (09): 1–14. Available at: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/21.pdf>
11. Stolpovskii YA, Lazebny OE, Stolpovskii KY, Sulimova GE. The use of the ISSR-PCR method for identifying domesticated animal breeds and species, inferring their population structures, and assessing gene pool similarity. *Russ. J. Genet.* 2010, 46 (6): 732–739. DOI: 10.1134/S1022795410060141.
12. The second report on the state of the world's animal genetic resources for Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2015. Available at: <https://www.fao.org/publications/card/en/c/46cdce20-7b52-4517-92bc-90e5d500c6f6>
13. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* 1994; 20 (2): 176–183. DOI: 10.1006/geno.1994.1151.

Genetic structure of the Ukrainian water buffalo population by ISSR-PCR markers

N. B. Mokhnachova

nataliia.mokhnachova82@gmail.com

Institute of Animal Breeding and Genetics named after M. V. Zubets NAAS,
1 Pogrebnyaka str., Chubynske village, Boryspil district, Kyiv region, 08321, Ukraine

The study of intraspecific genetic diversity of cattle, including species of the genus *Bubalus* from the subfamily Bull, is important because of the reduction of biodiversity of farm animals. The basis of genetic diversity is its genetic component. The loss of native species and breeds of cattle is a real threat to the biosphere, as the resilience of natural ecosystems and agroecosystems is directly linked to their genetic ability to adapt to environmental conditions. Polymorphism of ISSR-markers of the Ukrainian population of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the farm of "TASBIO" LLC (Chernihiv region) was analyzed in 66 animals selected for the study. Genomic DNA samples were isolated from venous blood with a standard set of reagents. Genotyping was performed using specific ISSR primers: (ACC)₆G, (GAG)₆C, (AG)₉C, (CTC)₆C, (AG)₈CA, (AG)₈CG and (GA)₆CC. We determined the difference in spectra both by the number of amplicons, their lengths (number of nucleotides) and by their polymorphism. As a result of the study, all primers showed polymorphism of buffalo DNA regions. Amplicons were defined in the range from 200 bp up to 4000 bp. Analysis of ISSR spectra revealed 87 loci, of which 71 were polymorphic. (AG)₈CA-marker was the least polymorphic (PIC=0.234), (CTC)₆C the most polymorphic (PIC=0.389). Conservative loci were found in four ISSR markers: 6 in (AG)₈CA marker, 5 in (AG)₈CG, 4 in (GA)₆CC, and 1 in (AG)₉C. 67 species-specific loci were identified for the Ukrainian water buffalo population: 10 for (AG)₉C, 3 loci for (ACC)₆G, 4 for (GAG)₆C, 7 for (CTC)₆C, 15 for (AG)₈CA, and 14 in (AG)₈CG and (GA)₆CC. The ISSR primers used are recommended for molecular genetic analysis of buffalo DNA polymorphism.

Key words: buffalo, genetic structure, DNA, polymorphism, markers, ISSR, locuses, molecular genetic analysis