

С. А. Аксютин, С. П. Пустовойт

Генетическая изменчивость фрагмента гена цитохромоксидазы мтДНК сибирского бурундука (*Tamias sibiricus*)

Аннотация. Сибирский бурундук распространен от Урала на востоке до Чукотки на западе. Сибирский бурундук является одним из типичнейших обитателей пойменных лесов Магаданской области. По материалам, собранным в июне 2016 г, впервые исследована генетическая изменчивость цитохромоксидазы мтДНК сибирского бурундука, обитающего возле г. Магадан. Нуклеотидное разнообразие указанного гена в выборке из шести особей сибирского бурундука составило $p = 0,00451 \pm 0,0004337$, гаплотипическое разнообразие $Hd = 0,933 \pm 0,0498$. Обнаружено пять гаплотипов. По величинам генетической дифференциации все особи распределяются на две группировки, одна состоит из двух особей, другая из четырех. Имеющиеся в базе IBOL 18 нуклеотидных последовательностей у особей, отловленных в разных участках ареала, параметры генетического разнообразия имеют сходные величины ($p = 0,00326 \pm 0,000167$ и $Hd = 0,843 \pm 0,2357$). Бурундуки, отловленные в северо-восточной части Китая, по величине генетической дифференциации представляют один кластер, в состав которого входит особь из Алтайского края. Магаданские бурундуки образуют отдельную группировку. Наиболее вероятная причина столь существенных генетических отличий — географическая изоляция магаданских бурундуков от животных из других участков ареала.

Ключевые слова: сибирский бурундук, цитохромоксидаза мтДНК, нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие, генетическая дифференциация, Магаданская область.

Авторы:

Аксютин Светлана Алексеевна — студентка 4 курса кафедры биологии и химии СВГУ, 685000, Магадан, ул. Портовая, 13, e-mail: kafb@svgu.ru;

Пустовойт Сергей Павлович — заведующий кафедрой биологии и химии СВГУ, старший научный сотрудник лаборатории популяционной генетики Института биологических проблем Севера Дальневосточного отделения РАН, 685000, Магадан, ул. Портовая, 13, e-mail: kafb@svgu.ru.

Митохондрии находятся почти во всех эукариотических клетках, большая часть аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) создается в этих органеллах. Кроме внешней мембраны митохондрии имеют внутреннюю, содержащую разные транспортные белки. Имеются так же белки, включенные в электронно-транспортную цепь (дыхательная цепь), проводящую окислительное фосфорилирование. Дыхательная цепь включает более 40 белков, сгруппированных в три больших дыхательных ферментативных комплекса: НАДН — дегидрогеназный комплекс, цитохром-bc 1- комплекс и цитохромоксидазный комплекс. Дыхательные комплексы — места переноса протонов и электронов через внутреннюю мембрану.

Цитохромоксидаза — белковый комплекс, который получает электроны от цитохрома с, окисляет его и передает электроны кислороду с получением молекулы воды. Эволюция цитохромоксидазы была направлена на улучшение использования кислорода как акцептора электронов, поэтому этот белковый комплекс очень важен для аэробной жизни [1].

Описанная важность белка цитохромоксидазы для работы митохондрий обусловила присталь-

ное внимание к изучению соответствующего гена митохондриальной ДНК у широкого круга живых организмов [2, 3]. В созданном для накопления сведений о генетической изменчивости этого гена сайте (www.ibol.org) на весну 2017 года содержатся записи (так называемые штрих коды) для 178 тысяч видов животных и более 5,5 млн нуклеотидных последовательностей.

Сибирский бурундук (*Tamias sibiricus*) относится к семейству Беличьих (Sciuridae) отряда Грызуны (Rodentia) и имеет отличительный признак — пять продольных темных полос на светлом или рыжевато-белом фоне спины и боков тела [4]. Большой ареал вида идет от Урала на западе до Чукотки на востоке. В последнее время отмечено проникновение особей этого вида на север полуострова Камчатка. В окрестностях г. Магадан это обычный вид мелких грызунов, обозначающий свое присутствие характерным свистом.

Несмотря на широкое распространение, генетическая изменчивость мтДНК (в частности цитохромоксидазы) сибирского бурундука изучена только в небольших выборках из небольшого числа локальностей в основном за пределами нашей

страны. Цель работы — провести анализ первых данных о генетическом разнообразии цитохромоксидазы сибирского бурундука, обитающего в окрестностях г. Магадана.

Материал и методика.

Особи бурундука отловлены на восточном склоне сопки, у подножия которой располагается морской порт. Лов проводился ловушкам Геро с приманкой (кусочки хлеба, пропитанные растительным маслом). Количество ловушек — 20 штук, ставились в одну линию через 5 метров. Лов проводился период с 6.06.2015 по 20.06.2015, ловушки проверялись один раз в день. Всего отловлено 6 бурундуков. Особи обозначены: первая TS-MGD-1-2014 и последняя TS-MGD-8-2014.

Для лабораторного анализа отобраны пробы мышц, которые хранились в этиловом спирте. Выделение мтДНК проведено стандартным фенол-хлороформным способом [5, 6]. Для проведения ПЦР использовали следующие праймеры: FishF1-5' TTC TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GG 3' Fish R1 5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA 3' [6]. Определение нуклеотидной последовательности исследуемого гена выполнено в ПАО «Синтол» ([www. syntol.ru](http://www.syntol.ru)).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей и конструирование дендрограмм выполнено при помощи программы MEGA 6.0 [7]. Количественное определение величин генетического разнообразия (нуклеотидное и гаплотипическое) осуществлено с использованием программы DnaSP [8].

Для сравнения с полученными были взяты аналогичные данные из общедоступной базы сайта International Barcode Of Life (IBOL, [www. ibol.org](http://www.ibol.org)). Авторы собранных в этом банке секвенсов бурундука использовали нуклеотидные последовательности прежде всего для филогенетических исследований разных наборов видов грызунов [9–12].

Результаты и обсуждение. Для генетического анализа использована нуклеотидная последовательность фрагмента гена цитохромоксидазы длиной 651 пар нуклеотидов. Нуклеотидные последовательности бурундука приведены в таблице 1. Нуклеотиды обозначены как обычно: А — аденин, С — цитозин, G — гуанин и Т — тимин. В таблице 1 указаны уникальные замены в нуклеотидных последовательностях. Обнаружено 2 трансверсии и 5 транзиций. Замены показаны относительно нуклеотидной последовательности TS-MGD-1-2014. Наибольшее число нуклеотидных замен (6 замен на 7 полиморфных сайтов) выявлено у особи № TS-MGD-3-2014. Пять замен являются транзициями, трансверсия обнаружена в сайте №169. Нуклеотидная последовательность гаплотипа TS-MGD-2-2014 включает трансверсию и три транзиции. Нуклеотидные замены в остальных уникальных гаплотипах указаны в таблице 1.

Обнаруженные замены носят селективно нейтральный характер (тест Таджимы $D = -0,25127$, $p > 0,10$). Нуклеотидное разнообразие составило $\pi = 0,00451 \pm 0,0004337$, гаплотипическое разнообразие $Hd = 0,933 \pm 0,0498$. Генетические дистанции между гаплотипами показаны на рис. 1.

Обращает на себя внимание высокая степень отличий второй и третьей особи от остальных (рис. 1). По этой причине хорошо заметны два кластера, один состоит из двух особей (TS-MGD-2-2014 и TS-

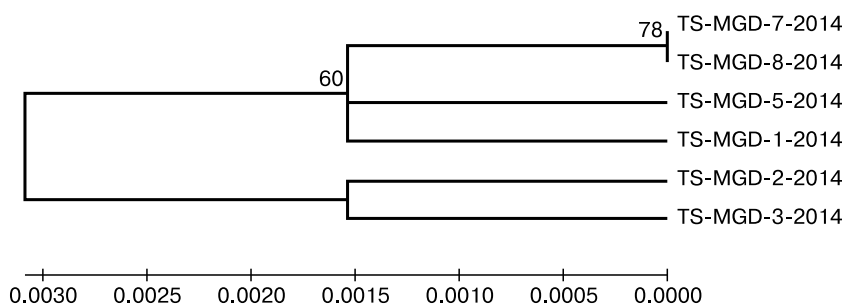


Рис. 1. Дендрограмма генетических отличий (величины р-дистанций) бурундуков, отловленных в окрестностях г. Магадана

Таблица 1. Нуклеотиды в полиморфных сайтах фрагмента гена цитохром оксидаза субъединицы 1 мтДНК сибирского бурундука

Код особи	169	285	355	366	447	565	637
TS-MGD-1-2014	С	G	С	Т	Т	С	G
TS-MGD-2-2104	G	A	•	С	•	Т	•
TS-MGD-3-2014	G	A	Т	С	С	Т	•
TS-MGD-5-2014	•	•	•	•	•	Т	Т
TS-MGD-7-2014	G	•	•	•	•	Т	•
TS-MGD-8-2017	G	•	•	•	•	Т	•

Примечание: точка в ячейке означает наличие того же нуклеотида, что и у первой особи.

Литература

1. Альбертс Б. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альбертс, Д.Брей, К.Хопкин, А. Джонсон, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, П. Уолтер // М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. — 768 с.
2. Шнеер В. С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений — способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия / В.С.Шнеер В. С. // Журнал общей биологии. — 2009. — Т. 70. — № 4. — С. 296 — 315.
3. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: The barcode of life data system ([www. barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)) / S. Ratnasingham, P.D.N. Hebert // Molecular Ecology Notes. 2007. Doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x.
4. Жизнь животных / Под ред. В.Е.Соколова. / М.: Просвещение, 1989. — Т. 7. Млекопитающие. — 558 с.
5. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук // М.: Мир, 1984. — 480 с.
6. Ivanova N. V. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA / N. V. Ivanova, J. R. Dewaard, P.D.H. Hebert // Molecular Ecology Notes. 2006. — P. 1–5. (doi: 10.1111 /j .1471-8286. 2006.01748.x).
7. Tamura K. MEGA6: MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // Molecular Biology and Evolution. — 2013. — 30. — P. 2725–2729.
8. Librado P. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data / P. Librado, J. Rozas // Bioinformatics. 2009. — 25. — P.1451–1452.
9. Obolenskaya E. V. Diversity of Palearctic chipmunks (*Tamias*, *Sciuridae*) / E. V. Obolenskaya, Mu-Y. Lee, N. E. Dokuchaev, T. Oshida, Mi-S. Lee, H. Lee, A. A. Lisovsky // Mammalia. — 2009. — 73. — P. 281–298.
10. Piaggio A. J. Molecular phylogeny of the Chipmunk inferred from mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase II gene sequences / A. J. Piaggio, G. S. Spicer // Molecular Phylogenetics and Evolution. — 2001. — V. 20. 3. — P. 335–350.
11. Piaggio A.J. Molecular phylogeny of the Chipmunk genus *Tamias* based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit II gene / A. J. Piaggio, G. S. Spicer // Journal of Mammalian Evolution. — 2000. — 7. 3. — P. 147–166.
12. Lee Mu-Y. Mitochondrial cytochrome b sequence variations and population structure of Siberian Chipmunk (*Tamias sibiricus*) in Northeastern Asia and population structure in South Korea / Mu-Y. Lee, A. A. Lisovsky, S. K. Park, E. V. Obolenskaya, N. E. Dokuchaev, Y. Zhang, Y. Li, Y. J. Kim, I. Voloshina, A. Myslenko, T. Y. Choi, Mi-S. Min, H. Lee // Molecules and Cells. — 2008. — 26. — P. 566–575.

Aksyutina S. A., Pustovoit S. P.

Genetic variation of the fragment of the cytochrome oxidase mtDNA of the Siberian chipmunk (*Tamias sibiricus*)

Abstract. *Siberian chipmunk is distributed from the Urals in the east to Chukotka in the west. Siberian chipmunk is one of the most typical inhabitants of the forests of the Magadan Region. Based on the materials collected in June 2016, the genetic variability of cytochrome oxidase mtDNA of the Siberian chipmunk, inhabiting near the city of Magadan, was first studied. The genetic variability of the Siberian chipmunk, inhabiting near the city of Magadan, was first investigated. The nucleotide diversity of six Siberian chipmunks was $\pi = 0.00451 \pm 0.0004337$, the haplotypic variety $Hd = 0.933 \pm 0.0498$. Five haplotypes were found. By the magnitude of genetic*

differentiation, all individuals are divided into two groups, one consists of two individuals, the other of four. We can assume that the individuals we studied are descendants of two female founders — we caught the members of two families, founded by two females. Available in the base of IBOL 18 nucleotide sequences in individuals caught in other parts of the range, the parameters of genetic diversity have similar values ($\pi = 0.00326 \pm 0.000167$ and $Hd = 0.843 \pm 0.2357$). Chipmunks caught in the north-eastern part of China, according to the magnitude of genetic differentiation, represent one cluster, which includes an individual from the Altai Territory. Magadan chipmunks form a separate grouping. The most likely cause of such significant genetic differences is the geographical isolation of Magadan chipmunks from animals from other parts of the range

Key words: Siberian chipmunk, cytochrome oxidase mtDNA, nucleotide and haplotypic diversity, genetic differentiation, Magadan Region.

Authors:

Aksyutina Svetlana Alekseevna — 4th year student of the Department of Biology and Chemistry, North Eastern State University, 685000, Magadan, ul. Portovaya street, 13, e-mail: kafbio@svgu.ru;

Pustovoit Sergey Pavlovich — Head of the Department of Biology and Chemistry, Senior Researcher, Laboratory of Population Genetics, Institute of Biological Problems of the North, Far East Division of the Russian Academy of Sciences, 685000, Magadan, Portovaya street, 13.

References

1. Alberts B. Essential Cell Biology / B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. // M: BINOM. Laboratoria znanii. 2015. — 768 s.
2. Shneyer V. S. DNA barcoding of animal and plant species as an approach for their molecular identification and describing of diversity / V. S. Shneyer // Zhurnal Obchei Biologii. — 2009. — 70. — № 4. — S. 296–315.
3. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org) / S. Ratnasingham, P.D.N. Hebert // Molecular Ecology Notes. 2007. Doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x.
4. Zhizn zhivotnykh / Ed. V. E. Sokolov / M.: Prosvechenie, 1989. — V. 7. Mlekopitayuchie. — 558 s.
5. Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual / T. Maniatis, E. E. Fritsch, J. Sambrook // M.: Mir, 1984. — 480 s.
6. Ivanova N. V. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA / N. V. Ivanova, J. R. Dewaard, P.D.H. Hebert // Molecular Ecology Notes. 2006. — P. 1–5. (doi: 10.1111 /j .1471-8286. 2006.01748.x)
7. Tamura K. MEGA6: MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // Molecular Biology and Evolution. — 2013. — 30. — P. 2725–2729.
8. Librado P. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data / P. Librado, J. Rozas // Bioinformatics. 2- 009. — 25. — P. 1451–1452.
9. Obolenskaya E. V. Diversity of Palearctic chipmunks (Tamias, Sciuridae) / E. V. Obolenskaya, Mu-Y. Lee, N. E. Dokuchaev, T. Oshida, Mi-S. Lee, H. Lee, A.A.Lisovsky // Mammalia. — 2009. — 73. — P. 281–298.
10. Piaggio A. J. Molecular phylogeny of the Chipmunk inferred from mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase II gene sequences / A. J. Piaggio, G. S. Spicer // Molecular Phylogenetics and Evolution. — 2001. — V. 20. 3. — P. 335–350.
11. Piaggio A. J. Molecular phylogeny of the Chipmunk genus Tamias based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit II gene / A. J. Piaggio, G. S. Spicer // Journal of Mammalian Evolution. — 2000. — 7. 3. — P. 147–166.
12. Lee Mu-Y. Mitochondrial cytochrome b sequence variations and population structure of Siberian Chipmunk (Tamias sibiricus) in Northeastern Asia and population structure in South Korea / Mu-Y. Lee, A. A. Lisovsky, S. K. Park, E. V. Obolenskaya, N. E. Dokuchaev, Y. Zhang, Y. Li, Y. J. Kim, I. Voloshina, A. Myslenko, T. Y. Choi, Mi-S. Min, H. Lee // Molecules and Cells. — 2008. — 26. — P. 566–575.