

О. В. Митрофанова, Н. В. Дементьева, В. И. Тыщенко, А. А. Крутикова, В. В. Гончаров

Оценка генетического полиморфизма ряда популяций северного оленя (*Rangifer tarandus*)

Аннотация. Методом гибридизации с зондом ГТГ5 проведено сравнение нескольких популяций дикого и домашнего северного оленя (*Rangifer tarandus*) различных районов России. В ходе анализа были обнаружены маркер-специфические участки ДНК, характерные для отдельных популяций. На основе картин распределения полос рассчитывали сходство и различия между популяциями, а также определяли степень гомогенности каждой популяции в отдельности.

Ключевые слова: полиморфизм, ДНК-фингерпринтинг, минисателлиты, полиморфизм, северный олень, *Rangifer tarandus*.

Авторы:

Митрофанова Ольга Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, «55А», +7 (921) 796-41-63, e-mail: mo1969@mail.ru;

Дементьева Наталия Викторовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, «55А», +7 (921) 743-07-43, e-mail: dementevan@mail.ru;

Тыщенко Валентина Ивановна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, «55А»;

Крутикова Анна Алексеевна — научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, «55А», +7 (812) 465-80-12, e-mail: anntim2575@mail.ru;

Гончаров Василий Викторович — кандидат сельскохозяйственных наук, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства и экологии Арктики — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр», Россия, г.Норильск, 663302, Комсомольская, д.1, e-mail: wgoncharow@mail.ru.

Районы Крайнего Севера занимают значительную часть территории России. В этих местах единственно возможным сельскохозяйственным объектом для разведения и использования коренным местным населением является северный олень (*Rangifer tarandus*). Этот вид животных отлично приспособился к суровому климату северных территорий.

Люди, проживающие в этих районах, научились использовать продукцию оленеводства практически полностью. Олень служит источником мяса, шкур, пантов, а так же приспособлен для того, чтобы быть использованным в упряжке и под седлом (олени эвенкийской породы).

На территории России общее поголовье оленей по разным данным колеблется от 1,5 до 3 млн особей, из которых около 1 млн составляют дикие северные олени.

На территории России официально зарегистрированы четыре породы северного оленя — ненецкая (самая многочисленная), эвенкийская, чукотская и эвенкская.

Исследовательский интерес к изучению генетического разнообразия северных оленей то возрастает, то сменяется относительно спокойным отношением к этой проблеме. В большой степени это связано с труднодоступностью материала для работы, поскольку основные места обитания северных оленей находятся вдалеке от населенных пунктов.

Наиболее часто встречаются работы, посвященные анализу полиморфизма микросателлитов ДНК. Так при сравнении количественных данных по генетическим расстояниям, рассчитанным между домашними оленями Аляски и России, наблюдались несколько большие различия, чем между отдельными стадами Аляски (5, 6).

Существуют теории о том, что северный олень из России мигрировал на Аляску около 100 лет тому назад. Характер генетического дрейфа у северных оленей был исследован при помощи анализа микросателлитных ДНК(4). В российском регионе изучен полиморфизм митохондриальной

ДНК северного оленя (7), а также полиморфизм ISSR-PCR-маркеров в Туве (1).

В работе (2) предпринята попытка создания мультилокусной панели анализа STR маркеров. Сформированная панель из 9 маркеров позволила оценить биоразнообразие оленей эвенкийской, эвенской и ненецкой пород, а так же тувинской популяции, которую некоторые исследователи рассматривают как самостоятельную группу.

Молекулярно генетические методы являются наиболее подходящими для того, чтобы вести контроль генетического разнообразия популяций различных животных с использованием ДНК-технологии (3).

Целью нашего исследования было оценить генетическую разнородность некоторых популяций северного оленя, а так же проанализировать степень генетического сходства между популяциями на основе минисателлитных маркеров.

Материалы и методы

Материалом для исследований послужила ДНК. Для того, чтобы сравнить популяции северного оленя из различных районов обитания (табл. 1), от животных были взяты образцы крови. Для хранения образцов использовали консервант ЭДТА, который предварительно был добавлен в каждую пробирку. После взятия крови образцы основательно перемешивали и замораживали. Оптимальная температура хранения материала составляет -20°C .

Выделение ДНК проводили по стандартной методике с использованием протеиназы К и фенола.

Для фингерпринтинга использовали зонд (GTG)₅, меченный дезоксигинином. Электрофорез проводили в трис-боратном буфере и 0,8% агарозном геле при напряжении 60 вольт около двух суток. Перенос одноцепочечной ДНК на нейлоновый фильтр осуществляли в специальной камере под вакуумом 80 мм рт.ст. в течение 1 часа. Гибридизация проходила в буфере $5\times\text{SSC}$ —

0,1% SDS — $5\times\text{Денхардт}$ при 45°C в течение 30 минут. Детекцию мест связывания зонда с геномной ДНК осуществляли иммунохимическим методом.

Основные популяционно-генетические параметры (число полос на фильтре, число локусов, коэффициент сходства, гетерозиготность) рассчитывали с помощью компьютерной программы GelstatsTM.

Результаты и обсуждение. В ходе гибридизации ДНК северного оленя с зондом, содержащим пятикратный повтор последовательности гуанин-тимин-гуанин, были выявлены несколько фрагментов ДНК в широком диапазоне длин. Самыми крупными детектируемыми участками являются фрагменты, состоящие примерно из 23 тысяч пар нуклеотидов. Наименьшая длина гибридизованного участка составила 2 тысячи п.н.

Каждая из изученных популяций отличалась определенным набором ДНК-фрагментов. Часть полос можно назвать маркерными, если частота их встречаемости превышает значение 0,7 (табл. 2). Это, например, полосы размером 3750 п.н. и 3000 п.н., которые встречались с высокой частотой у диких северных оленей.

На основе показателей внутригрупповых коэффициентов сходства, можно сделать выводы о высокой гетерогенности эвенкийской породы ($BS = 0,36$). Продолжительный отбор по консолидации в этой породе, содержание оленей в таежной зоне, использование их как выючных животных привело к экстерьерным и поведенческим отличиям эвенкийских оленей от остальных. К сожалению, в рамках метода выявления полиморфизма ДНК на основе минисателлитов, популяция показала себя как разнородная.

Гетерогенной группой показали себя и олени ненецкой породы, разводимые в районе города Нарьян-Мар ($BS = 0,35$).

Для эвенкийской породы характерна так же высокая гетерозиготность ($H = 0,70$), рассчитанная

Таблица 1. Районы взятия крови северных оленей для выделения ДНК

№	Популяция	Район взятия образцов	Кол-во особей
1	Дикие северные олени	п-ов Таймыр	11
2	Домашние северные олени эвенкийской породы	п. Суринда, Красноярский край, Эвенкийский р-н	9
3	Домашний северный олень ненецкой породы	п. Тухард, Красноярский край, Таймырский Долгано-Ненецкий район	10
4	Домашний северный олень ненецкой породы	п. Потапово, Красноярский край, Таймырский Долгано-Ненецкий район	10
5	Домашний северный олень ненецкой породы	район г.Нарьян-Мар, Ненецкий автономный округ	10

Таблица 2. Фрагменты ДНК, выявляемые с помощью мультилокусного фингерпринтинга, характерные для различных популяций северного оленя

№	Популяция	Размер и частота встречаемости фрагментов
1	Дикие северные олени	3750 п.н. (0,9)3000 п.н. (0,9)2600 п.н. (0,7)
2	Эвенкийская порода	11500 п.н. (0,89)5200 п.н. (1,0)
3	Ненецкая порода (п. Тухард)	5300 п.н. (0,9)4700 п.н. (0,8)4300 п.н. (0,8)
4	Ненецкая порода (п. Потапово)	5200 п.н. (1,0)
5	Ненецкая порода (г. Нарьян-Мар)	4450 п.н. (0,75)4000 п.н. (0,88)

на основе распределения фрагментов на фильтре с помощью программы Gelstat. Уровень полиморфизма составил 100%, при этом было проанализировано 9 животных, а среднее число локусов составило 19,8.

Близкими по основным генетическим показателям и степени однородности популяций оказались олени ненецкой породы, разводимые в районе поселков Тухард и Потапово.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

На основе анализа картин распределения ДНК-фрагментов, полученных в ходе гибридизации с зондом (GTG)⁵ выявлен ряд маркерных для различных групп оленей фрагментов.

Отмечена высокая генетическая гетерогенность оленей эвенкийской породы, а также оленей ненецкой породы, разводимой в районе города Нарьян-Мар.

Для оленей ненецкой породы, разводимых в районах поселков Таймырского Долгано-Ненецкого района (Тухард и Потапово) наблюдалась относительно низкая гетерозиготность.

Литература

1. Кол Н. В., Полиморфизм ISSR-PCR-маркеров в тувинской популяции северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) / Н. В. Кол, О. Е. Лабезный // Генетика. — 2006. — № 12. — С. 1731–1734
2. Харзинова В. Р. Разработка мультиплексной панели микросателлитов для оценки достоверности происхождения и степени дифференциации популяций северного оленя *rangifer tarandus* / В. Р. Харзинова, Е. А. Гладырь, В. И. Федоров, Т. М. Романенко, Л. Д. Шимит, К. А. Лайшев, Л. А. Калашникова, Н. А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология. — 2015. — № 50(6). — С. 756–765
3. Яковлев А. Ф. Контроль генетического разнообразия при использовании ДНК-технологии / А. Ф. Яковлев, Н. В. Дементьева, В. П. Терлецкий, В. И. Тыщенко, О. В. Митрофанова, Л. Тучемский, Г. Гладкова // Птицеводство. — 2008. — № 12. — С. 3–5.
4. Cote S. D. Microsatellite DNA evidence for genetic drift and philopatry in Svalbard reindeer / S. D. Cote, J. F. Dallas, F. Marshall, R. Irvine, R. Langvatn, S. D. Albon // Mol. Ecol. — 2002. — 11(10):1923–1930.
5. Cronin M. A. Genetic variation in caribou and reindeer (*Rangifer tarandus*) / M. A. Cronin, J. C. Patton, N. Balmysheva, M. D. MacNeil // Animal Genetic. — 2003. — № 34(1). — P. 33–41.
6. Cronin M. A. Mitochondrial DNA and microsatellite DNA variation in domestic reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) and relationships with wild caribou (*Rangifer tarandus granti*, *Rangifer tarandus groenlandicus*, and *Rangifer tarandus caribou*) / M. A. Cronin, M. D. Macneil, J. C. Patton // J. Heredity. — 2006. — № 97(5). — P. 525–530.
7. Kol N. V. Mitochondrial DNA polymorphism in Tuvian population of reindeer *Rangifer tarandus* L. / N. V. Kol, A. L. Korolev, I. A. Zacharov // Genetika. — 2006. — № 42(1). — P. 110–112.

Mitrofanova O., Dementieva N., Tyshchenko V., Krutikova A., Goncharov V.

Assessment of genetic polymorphisms of several populations reindeer (*Rangifer tarandus*)

Abstract. By hybridization with a probe GTG5 comparison of several wild and domestic reindeer population (*Rangifer tarandus*) of different regions of Russia. During the tests the marker-specific sections of DNA were found specific to individual populations. Based on the pattern of distribution of the bands calculated similarities and differences between populations, and determined the degree of homogeneity of each population separately.

Keywords: polymorphisms, DNA fingerprinting, minisatellite, reindeer, *Rangifer tarandus*.

Authors:

Mitrofanova O. — PhD (Biol. Sci.), senior researcher of the Laboratory of Molecular Genetics, Russian research institute of farm animal genetics and breeding, St. Petersburg, Russia, Moscovskoe sh., 55-a, e-mail: mo1969@mail.ru;

Dementieva N. — PhD (Biol. Sci.), leading researcher of the Laboratory of Molecular Genetics, Russian research institute of farm animal genetics and breeding, St. Petersburg, Russia, Moscovskoe sh., 55-a, e-mail: dementevan@mail.ru;

Tyshchenko V. — PhD (Biol. Sci.), senior researcher of the Laboratory of Molecular Genetics, Russian research institute of farm animal genetics and breeding, St. Petersburg, Russia, Moscovskoe sh., 55-a;

Krutikova A. — researcher of the Laboratory of Molecular Genetics, Russian research institute of farm animal genetics and breeding, St. Petersburg, Russia, Moscovskoe sh., 55-a, e-mail: anntim2575@mail.ru;

Goncharov V. — PhD (Agr. Sci.), Research Institute of Agriculture and Ecology of the Arctic — Branch of the «Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center», 663302, Russia, Norilsk, Komsomolskaya st, 1, e-mail: wgoncharow@mail.ru

References

1. Kol N. V., Polimorfizm ISSR-PCR-markerov v tuvinskoj populjacii severnogo olenja (*Rangifer tarandus* L.) / N. V. Kol, O. E. Labeznyj // Genetika. — 2006. — № 12. — S. 1731–1734
2. Harzinova V. R. Razrabotka mul'tipleksnoj paneli mikrosatellitov dlja ocenki dostovernosti proishozhdenija i stepeni differenciacii populjacij severnogo olenja rangifer tarandus / V. R. Harzinova, E. A. Gladyr', V. I. Fedorov, T. M. Romanenko, L. D. Shimit, K. A. Lajshev, L. A. Kalashnikova, N. A. Zinov'eva // Sel'skhozjajstvennaja biologija. — 2015. — № 50(6). — S. 756–765
3. Jakovlev A. F. Kontrol' geneticheskogo raznoobrazija pri ispol'zovanii DNK-tehnologii / A. F. Jakovlev, N. V. Dement'eva, V. P. Terleckij, V. I. Tyshhenko, O. V. Mitrofanova, L. Tuchemskij, G. Gladkova // Pticevodstvo. — 2008. — № 12. — S. 3–5.
4. Cote S. D. Microsatellite DNA evidence for genetic drift and philopatry in Svalbard reindeer / S. D. Cote, J. F. Dallas, F. Marshall, R. Irvine, R. Langvatn, S. D. Albon // Mol. Ecol. — 2002. — 11(10):1923–1930.
5. Cronin M. A. Genetic variation in caribou and reindeer (*Rangifer tarandus*) / M. A. Cronin, J. C. Patton, N. Balmysheva, M. D. MacNeil // Animal Genetic. — 2003. — № 34(1). — P. 33–41.
6. Cronin M. A. Mitochondrial DNA and microsatellite DNA variation in domestic reindeer (*Rangifer tarandus*) and relationships with wild caribou (*Rangifer tarandus* granti, *Rangifer tarandus* groenlandicus, and *Rangifer tarandus* caribou) / M. A. Cronin, M. D. Macneil, J. C. Patton // J. Heredity. — 2006. — № 97(5). — P. 525–530.
7. Kol N. V. Mitochondrial DNA polymorphism in Tuvian population of reindeer *Rangifer tarandus* L. / N. V. Kol, A. L. Korolev, I. A. Zacharov // Genetika. — 2006. — № 42(1). — P. 110–112.