

на правах рукописи

Кол Наталья Владимировна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ
В ПОПУЛЯЦИИ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ (*Rangifer tarandus*)
РЕСПУБЛИКИ ТЫВА (Тоджинского района)**

Специальность 03.00.15 – генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

МОСКВА

2006 г.

Работа выполнена в лаборатории сравнительной генетики животных Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: член-корреспондент РАН, профессор
Захаров-Гезехус Илья Артемьевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор биологических наук
Калашникова Любовь Александровна
кандидат биологических наук
Малинина Татьяна Владимировна

ВЕДУЩЕЕ УЧРЕЖДЕНИЕ: Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН

Защита состоится «19» 10. 2006 года в «____» часов на заседании Диссертационного совета Д 002.214.01 при Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991 ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д.3. Факс: (495) 132-89-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан «____» 2006 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук **Полухина Галина Николаевна**

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Северный олень (*Rangifer tarandus* L.) имеет циркумполярный ареал, населяет тундровую и таежную зону Старого и Нового Света и многие острова Северного Ледовитого Океана (Гептнер и др., 1961). Северный олень относится к числу немногих видов, у которых дикая форма существует с домашней, он играет важную роль в хозяйстве Севера, обеспечивая занятость и благосостояние малочисленных народов этого огромного региона, являясь объектом как промысла, так и разведения (Сыроечковский, 1989). Домашние олени разводятся по всей тундровой зоне России от Кольского полуострова до Чукотки включительно, а в Сибири – и в горно-таежной зоне, захватывая территорию до 50° с.ш. (Шубин, Ефимцева, 1988).

Общее поголовье домашних оленей за последнее десятилетие сократилось в два раза. На данный момент поголовье домашних оленей самое низкое за последние сто лет, с начала XX века. До этого очень низкий уровень был в 1930-е годы, когда в результате коллективизации поголовье оленей в стране снизилось с двух до полутура миллионов голов.

Пастбища, освободившиеся из-за падения численности домашних оленей, в скором времени занимаются дикими оленями, что делает восстановление домашнего оленеводства почти невозможным. Численность диких оленей быстро растет, особенно на Северо-Востоке России. По оценкам специалистов она уже значительно превысила численность домашних. Между тем именно домашнее оленеводство является основой хозяйства и культуры большинства коренных народов Севера России (Клоков, 2001).

Имеется реальная опасность исчезновение оленеводства на больших территориях и в Восточной части Сибири. Там исчезновение оленеводства означает уменьшение биологического разнообразия и утрату уникальных и ценных культур малочисленных народностей, а это может обернуться без преувеличения этнической катастрофой (Donahoe, 2003).

Северные олени, обитающие в Республике Тыва (Тува), относятся к одной из наиболее южных популяций домашнего северного оленя. Основная масса стад тувинской популяции сосредоточена на северо-востоке республики в Тоджинском

районе (Тожу). Этот район граничит с территориями проживания малых народностей: тофа (тофалары, в Иркутской области), сойоты (Республика Бурятия), духа (также известные как цаатан, в северо-западной Монголии), которые также занимаются оленеводством. Все перечисленные территории географически изолированы от основного арсала оленеводства, занимающего тундру и лесотундру Сибири и Европейской части Российской Федерации. Южно-сибирские и северо-монгольские группы оленеводов разводят небольшие стада оленей в тайге и альпийской тундре и используют оленей преимущественно как выночных и верховых животных при охоте, а также для получения молочных продуктов.

Снижение в последние годы численности домашних оленей в Туве делает необходимым генетическое изучение этой популяции, без чего невозможно оценить опасность потери генетического разнообразия и выработать рекомендации по его сохранению.

Цели и задачи исследования

Цель исследования заключалось в изучении генетического разнообразия популяции домашнего северного оленя Тоджинского района Республики Тыва на основании изучения полиморфизма митохондриальной и ядерной ДНК и сравнения с результатами изучения полиморфизма ДНК других популяций. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- 1) сбор информации о численности домашних северных оленей в Туве, половозрастном составе популяции; сбор ДНК-содержащих образцов;
- 2) секвенирование фрагмента контрольного региона Д-петли митохондриальной ДНК, с целью получения информации о нуклеотидной последовательности и степени вариабельности мтДНК в популяции Тувы;
- 3) проведение статистического анализа для определения уровня генетического полиморфизма внутри тувинской популяции;
- 4) сравнение изменчивости мтДНК популяции оленей Тувы с популяциями Чукотки, Якутии, Магаданской области и данными из GeneBank;
- 5) изучение полиморфизма хромосомной ДНК в популяции оленей Тувы посредством анализа межмикросателлитного полиморфизма (ISSR).

Научная новизна и практическая ценность работы

На территории России северные олени были достаточно широко изучены с помощью методов белкового электрофореза (Шубин, Ефимцева, 1988; Шубин, 1991), более современные методы изучения генетического разнообразия к популяциям северного оленя в России практически не применялись. В работе впервые изучен полиморфизм контрольного региона мтДНК северных оленей Тувы, а также Чукотки, Якутии и Магаданской области. Впервые применен метод ISSR для анализа полиморфизма у северных оленей. Были собраны данные по динамике численности и о половозрастной структуре популяции домашних оленей Тувы. Уменьшение ее численности указывает на реальную опасность потери генетического разнообразия, а также снижения её жизнеспособности и способности к адаптации. Практическая ценность работы состоит в том, что использованный в работе метод ISSR может быть рекомендован как один из методов проведения мониторинга генетического состояния популяции и оценки внутрипопуляционного полиморфизма, что позволит минимизировать возможные неблагоприятные генетические последствия.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на конкурсе молодых ученых Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН и кафедры генетики биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 2003; Всероссийской конференции молодых ученых «Экология: от генов до экосистем», Екатеринбург, 2005; Международном рабочем совещании «Происхождение и эволюция биосфера», Новосибирск, 2005; научной школе молодых ученых «Актуальные проблемы современной генетики» при Международной конференции «Генетика в России и мире», посвященной 40-летию Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва, 2006; на 6-ом Международном конгрессе биологии оленей (The 6th International Deer Biology Congress), Прага, Чешская Республика, 2006.

Структура и объем диссертации. Публикации

Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материал и методы, результаты работы и их обсуждение, практические рекомендации, выводы, список использованной литературы и приложения. Работа изложена на 112 страницах

машинописного текста, иллюстрирована 16 рисунками и содержит 6 таблиц. Список цитированной литературы включает 127 источников отечественных и зарубежных авторов.

По материалам работы опубликовано 6 печатных работ.

В обзоре литературы рассматриваются следующие вопросы: систематика и биология северного оленя, характеристика домашних и диких оленей, генетическое изучение популяций северного оленя.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были изучены популяции домашних северных оленей из Тоджинского района Республики Тыва и Чукотского автономного округа. В ходе экспедиций в 2003-2004 годах в оленеводческих хозяйствах Тоджинского района Республики Тыва была определена структура стад по полу (половой состав), изучена изменчивость по морфологическим признакам и собраны ДНК-содержащие образцы в количестве 62. Для построения графиков динамики численности северных оленей использовались данные Госкомстата РФ и Министерства сельского хозяйства Республики Тыва.

Чукотские образцы, в количестве 36, были собраны в ваежской популяции, р. Великая, аспирантом Нувало В. (руководитель д.б.н. Богословская Л.С.).

Выделенная ДНК северного оленя из Якутии, Магаданской области (Северо-Эвенский район) и севера Чукотского автономного округа, всего 11 образцов, были любезно предоставлены д.б.н. Малярчуком Б.А.

В данной работе материалом для выделения ДНК были кусочки необработанных шкур сравнительно недавно забитых животных. Использовали набор для выделения ДНК из различного биологического материала *DIAtoTM DNA Prep 100* (Изоген, Москва). Выделение ДНК проводили согласно протоколу фирмы изготовителя.

Для проведения ПЦР был выбран участок D-петли митохондриальной ДНК размером 470 пн. Были взяты следующие праймеры L15394 и H15947 (Flagstad, Roed, 2003). Секвенирование осуществляли с прямого и с обратного праймера на автоматическом ДНК-секвенаторе.

При проведении анализа ISSR полиморфизма, в каждом образце регистрировали присутствие фрагментов, проводя отжиг праймеров на соответствующих участках узнавания межмикросателлитных локусов. Для ППР-амплификации использовали два праймера (AG)₉C и (GA)₉C.

Выравнивание и анализ полученных нуклеотидных последовательностей проведен с помощью программ GeneBee BLAST 2.2.8. и BLAST (http://www.genebee.msu.ru/blast_new/blast.html; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Также в работе были использованы последовательности, полученные из базы данных GeneBank: AY178670 TarN102; AY178683 TarN104; AY178679 TarR1; AY178680 TarR3; AY178728 TarR4; AY178690 Car20; AY178696 Gro59.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мтДНК проведен с использованием пакета программ MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Для анализа эволюционных взаимоотношений использовали пакет программ Network 4108. При анализе ISSR-полиморфизма для определения размера продуктов амплификации использовали программу “OneDscan”. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы GELSTATS version 2.6 (Pelikan, Rogstad, 1996).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Современное состояние оленеводства в Туве. Основная популяция домашнего северного оленя Республики Тыва обитает на северо-востоке республики в Тоджинском районе, незначительные по численности стада имеются в Кая-Хемском и Кызыльском районах.

Сведений о состоянии оленеводства в первой половине XX века мало. Вероятно, самым благоприятным периодом следует считать конец 1930-х годов: по некоторым данным архива Министерства сельского хозяйства Республики Тыва численность оленей тогда достигала 19 тысяч голов, что приближается максимально возможному поголовью оленей на данной территории (рис. 1).

Падению оленеводства в Тоджинском районе в течение короткого времени, в 1946-1950 годах, способствовал ряд обстоятельств: закрытие приисков, эпидемия неустановленной болезни дыхательных органов оленей и коллективизация. Коллективизация, осуществление идеи перехода к оседлости, создание колхозов, а в

последующем совхозов, имело самые пагубные последствия, нарушило установленный веками уклад жизни таежных кочевников-оленеводов.

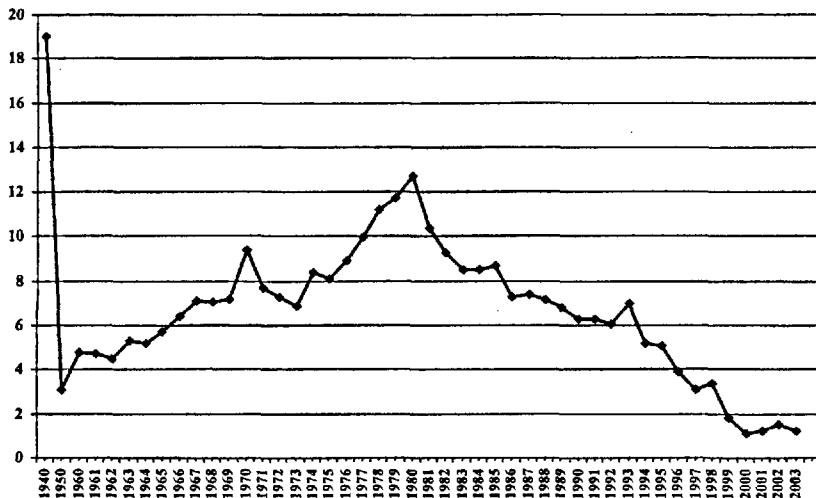


Рис. 1. Динамика численности поголовья оленей (тыс. голов) в Республике Тыва (Минсельхоз РТ).

В последствии наибольший пик численности оленей был достигнут в 1980 году и составил 12,7 тыс. голов. В дальнейшем падение численности связано с тем, что из-за укрупнения стад оленей они стали менее мобильными, редко менялись пастища (2-3 раза за лето), стали более подверженными болезням.

В настоящее время домашнее оленеводство в республике после деления совхозных стад по паям сосредоточено в руках аратов-оленеводов, и сейчас общее поголовье составляет не более 1200 животных.

2. Структура популяции северного оленя Тывы. В нашей работе мы исследовали одну из самых южных популяций домашнего северного оленя, обитающую в Республике Тыва (Тыва), на северо-востоке республики в Тоджинском районе (Тожу), где и был собран использованный в работе материал. На территории

Тоджинского района находятся приблизительно 20 оленеводческих хозяйств, численность оленей в которых варьирует от 30 до 65 оленей.

Для оценки состояния популяции северного оленя в Тоджинском районе нам было важно определить структуру стада по полу (половой состав), в частности потому, что изучаемая нами митохондриальная ДНК наследуется строго по материнской линии.

В связи с этим мы обследовали несколько оленеводческих хозяйств (табл. 1), где выявили, что в каждом стаде от 1 до 4 быков-производителей приходится на 3-19 воженок (половозрелых самок). Более половины поголовья составляет молодняк; около 10% – рабочие (кастрированные) олени-самцы. Суммарная численность обследованных нами стад составляет примерно 18% всего поголовья оленей республики.

Таблица 1. Возрастной и половой состав стад

	1	2	3	4	5	6	Всего:
Быки-производители	1	1	2	4	1	1	10
Рабочие олени	5	1	3	1	5	4	19
Воженки	19	10	12	15	3	4	63
Молодняк	37	22	23	30	3	6	121
ИТОГО:	62	34	40	50	12	15	213

1-6 – просмотренные стада

Для того чтобы охарактеризовать разнородность стад, мы рассмотрели изменчивость оленей по окраске. Окрас или масть домашних северных оленей – наследственный и наиболее очевидный фенотипический признак их доместикации: домашние олени более разнородны по окраске, чем дикие северные олени, которые практически все окрашены однотонно. В обследованных стадах можно выявить 4 типа окраса, преобладает коричневый окрас, но встречаются – чисто белые особи, коричневые и белые с пятнами и “родинками”. Доля таких животных в обследованных стадах оказалась различной, что может говорить о некоторой генетической дифференциации внутри Тоджинской популяции северного оленя.

3. Полиморфизм последовательностей контрольного региона D-петли митохондриальной ДНК северного оленя Тувы. Для анализа полиморфизма митохондриальной ДНК методом полимеразной цепной реакции с использованием праймеров L15394 и H15947 (Flagstad, Roed, 2003), был амплифицирован фрагмент длиной 470 пн контрольного региона D-петли митохондриальной ДНК (рис. 2). Полученные продукты ПЦР амплификации были очищены для последующего секвенирования. Для 29 образцов были получены нуклеотидной последовательности исследуемого фрагмента mtДНК (см. Приложение 1 диссертационной работы).

AATAGCCCCACTATCAGCACCC....ATTCTTAATACCCCCCACAGTATATGG
GCCCGGAGCGAGAAGAGGGATCCCTGCCAAGGGGTTGCTGGTTCACGC
GGCATGGTAGTTAACGCTCGTATCTAGGGGGGGGATACCGATGTTGACA
AGAAAAGGATTGACTTAATGTGCTATGTACGATCAATAATTATGTACTAT
GTACTATAATAATGTCAAGTACTTGCTTATAGCATGGGCATGTAATTAA
ATGTACTATTATAACATAATATGTCTTAATACATTAATTATGTACTATAGC
CGTACAAGACCATATATGTACGTTATAAAATTTATGTAGTTAATGATAT
TTAAGATATAATATGGCTATTGAGTGAGAAGCTGATTAATCTTGAAAGG
TTTTAAATTAAACTGACAAGGCTCTGAATTGGAAACTTATTACAACCTCAC...TATGCCCTGAAGTAA
GAACCCAG

Рис. 2. Нуклоситидная последовательность фрагмента D-петли митохондриальной ДНК северного оленя, образец Tuva-60 (в начале и в конце представлены праймеры).

Каждая из полученных последовательностей была внесена в программу BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), и идентифицирована как последовательность фрагмента контрольного региона D-петли митохондриальной ДНК северного оленя.

Наши данные по нуклеотидным последовательностям контрольного региона D-петли митохондриальной ДНК северного оленя Тувы были опубликованы в GenBank под следующими номерами:

Rangifer tarandus tarandus mitochondrial D-loop, from Republic of Tyva:
AM109922 Tozhu 1; AM110750 Tozhu 2; AM110751 Tozhu 3; AM110752 Tozhu 4;
AM110753 Tozhu 5; AM110754 Tozhu 6; AM110755 Tozhu 7; AM110756 Tozhu 8
(см. Приложение 2 диссертационной работы).

Компьютерный анализ с использованием программы MEGA 3.1. Для последующего компьютерного анализа, после выравнивания, была взята последовательность длиной 418 пн. В ней с помощью программы MEGA 3.1. (Kumar *et al.*, 2004) был проведен анализ изменчивости нуклеотидного состава и филогенетический анализ последовательностей.

Были подсчитаны средние значения частот нуклеотидов mtДНК тувинской популяции оленей: среднее процентное содержание нуклеотида Т составило 31,5%; С – 21,6%; А – 34, 2%; Г – 12,7%. В изученной последовательности четко выявляются консервативные области в начале – с 1 по 150 пн и в конце с 355 по 418 пн. В вариабельных областях выявлены транзиции 12 замен Т/С, С/Г, 2 замена Г/А и 1 трансверсия (замена С/А). При сравнении всех изученных нуклеотидных последовательностей количество вариабельных сайтов составило 3,5% от общего числа нуклеотидов. Было определено нуклеотидное разнообразие в изученной популяции, которые оказалось равным $p=0,0086\pm 0,00234$.

В изученной популяции Тувы обнаружено 8 митотипов, наиболее многочисленный один, выявленный у 18 животных из 29. К тувинскому материалу мы присоединили образцы, полученные из Чукотки, Якутии, Магаданской области (Северо-Эвенский район). Было построено филогенетическое дерево на основе нуклеотидных последовательностей с помощью метода NJ (Neighbor-Joining). Соответствующая дендрограмма представлена на рисунке 3. В этой дендрограмме выявляется отдельная большая группа из Тувы, состоящая из 18 животных, и примыкающие к ней 2 небольшие группы (Tuva-8, Tuva-57; Tuva-46, Tuva-48). В отдельный кластер группировались 4 образца (Tuva-12, Tuva-40, Tuva-43, Tuva-62). Некоторые образцы из Чукотки (Chukotka-10, Chukotka-11, Chukotka-3) кластеризуются с тувинскими, 4 образца из Чукотки: Chukotka-4, Chukotka-8, Chukotka-12, Chukotka-13 образуют самостоятельный кластер. Образцы из Якутии, Магаданской области и один образец из Тувы (Tuva-61) на дендрограмме занимают обособленное положение. Поскольку несколько образцов из Чукотки и Якутии оказались отличными от тувинских, можно предполагать о наличии генетической дифференциации популяций Тувы от северных популяций, хотя для окончательного заключения необходимо изучение значительно большего материала из северных популяций.

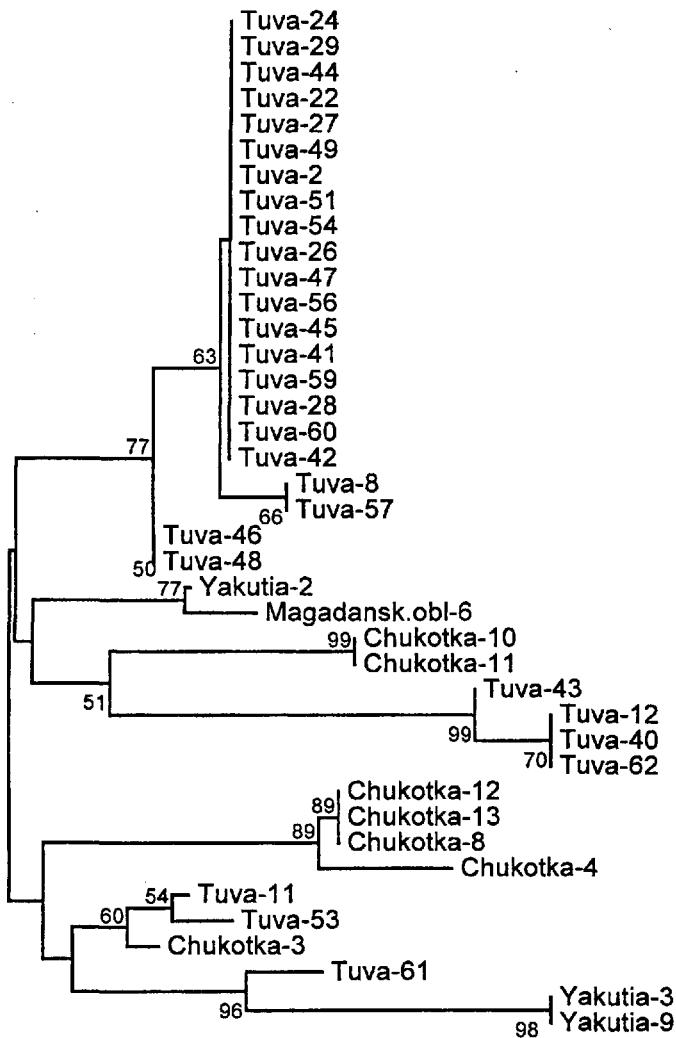


Рис. 3. Дендрограмма сходства последовательностей нуклеотидов D-петли митохондриальной ДНК северных оленей Тувы, Чукотки, Якутии и Магаданской области. Цифры у ветвей – значение бутсрэп-индекса (500 повторностей). Длина ветвей пропорциональна генетическим дистанциям.

Компьютерный анализ с использованием программы NETWORK. Для анализа эволюционных взаимоотношений между последовательностями главной некодирующей области (контрольного региона) мтДНК использовали метод медианных сетей и его алгоритмы RM (reduced-median) и MJ (median-joining) (Bandelt *et al.*, 1999), реализованные в пакете компьютерных программ Network 4108. Метод медианных сетей позволяет вводить в анализ медианные векторы (mv), т.е. гипотетические типы ДНК, не обнаруженные в исследовании, но требуемые для соблюдения принципа минимизации числа эволюционных событий. Генетические дистанции ρ между последовательностями мтДНК рассчитывали как среднее число мутаций между генотипами-основателями и производными типами ДНК, входящими в состав соответствующих филогенетических кластеров ДНК (Forster *et al.*, 1996). Исходя из предположения о том, что скорость дивергенции нуклеотидных последовательностей контрольного региона мтДНК у животных составляет примерно 16% за миллион лет (Brown *et al.*, 1979), генетическому расстоянию $\rho = 1$ соответствует время, равное 13300 годам для участка ДНК длиной 470 пар нуклеотидов.

Результаты статистического анализа медианной сети указывают на существование в изученной последовательности ДНК по меньшей мере восьми нуклеотидных позиций (158, 192, 256, 277, 290, 316, 333, 354), характеризующихся высоким уровнем гомоплазии – от шести до трех параллельных мутаций на позицию. На рисунке 4 показано MJ-дерево нуклеотидных последовательностей контрольного региона мтДНК оленей, построенное с учетом нестабильности указанных выше нуклеотидных позиций. В этом случае филогенетическое дерево типов мтДНК характеризуется отсутствием циклических структур и существенным снижением числа медианных векторов (до восьми). Эволюционный возраст мтДНК оленей в пределах подвида *R. t. tarandus*, к которому относятся и олени Тувы, составляет более 60 тысяч лет (62944 ± 16740 лет для $\rho = 4.73 \pm 1.26$), однако эту оценку необходимо рассматривать как предварительную и соответствующую, по-видимому, одному из периодов экспансии данного подвида северного оленя. Более реалистичными являются оценки эволюционного возраста отдельных группировок типов мтДНК у тувинских оленей. Так, один из кластеров включает в свой состав 22 особи (кластер

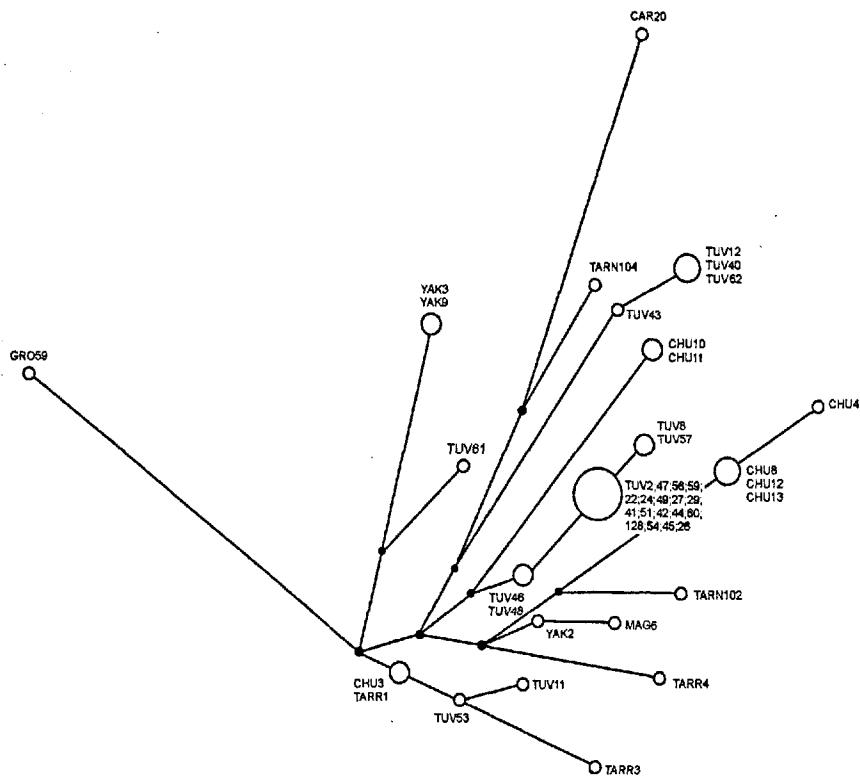


Рис. 4. Медианная сеть, построенная для нуклеотидных последовательностей контрольного региона mtДНК северных оленей популяции Тувы (TUV), Чукотки (CHU), Магаданской области (MAG), Якутии (YAK), а также оленей подвидов *R. t. tarandus* (TAR), *R. t. groenlandicus* (GRO), *R. t. caribou* (CAR). Чёрные кружки – гипотетические предковые последовательности ДНК.

берет начало от образцов TUV46 и TUV48) и характеризуется возрастом 13298 ± 12101 лет ($\rho = 1.0 \pm 0.91$). Другой кластер, включающий особи TUV43, TUV12, TUV40 и TUV62, имеет возраст 9974 лет ($\rho = 0.75$). Третий кластер включает как тувинских оленей TUV11 и TUV53, так и оленей из других регионов Евразии и характеризуется возрастом 15958 ± 9176 лет ($\rho = 1.2 \pm 0.69$). Возраст этих трех

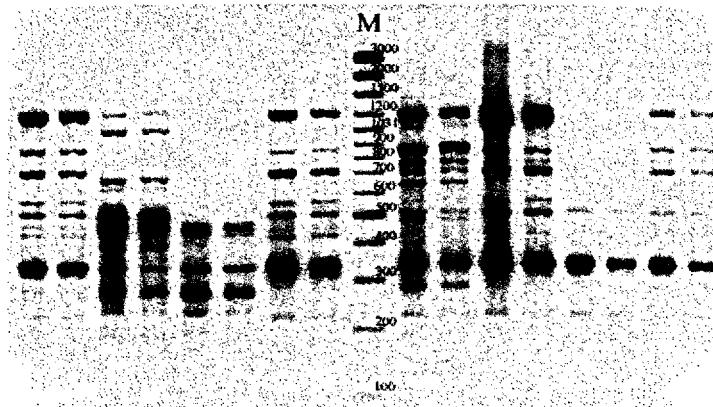
эволюционных линий превышает вероятное время доместикации северного оленя, что может говорить о том, что одомашниванию подверглась достаточно многочисленная группа оленей.

4. Полиморфизм межмикросателлитных локусов у северного оленя Тувы.

Для оценки внутрипопуляционного генетического разнообразия нами был использован анализ межмикросателлитного полиморфизма ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Этот метод относится к методам молекулярного мультилокусного анализа, он позволяет одновременно оценивать полиморфизм десятков локусов (до 30 локусов и больше) и более информативен для оценки уровня генетического разнообразия генофондов, чем локус-специфические маркеры.

Нами впервые был проведен анализ межмикросателлитного полиморфизма в тувинской популяции северного оленя. Методом ISSR-PCR путем сравнения спектра продуктов ПЦР, полученных в результате использования двух различных праймеров на основе динуклеотидных повторов (AG и GA), было исследовано 62 животных. Использование праймера (AG)₉C позволило получить более широкий спектр продуктов амплификации по сравнению с праймером (GA)₉C. С праймером (AG)₉C выявили всего 39, а с праймером (GA)₉C – 32 фрагмента различной длины (рис. 5). На рисунке 6 изображены профили частот обнаруженных фрагментов. Из рисунка видно, что для маркера AG длинные и короткие по размеру фрагменты представлены в целом более низкими частотами, чем средние. Для маркера GA прослеживается тенденция увеличения частоты фрагмента в зависимости от уменьшения его длины. Также необходимо отметить, что в исследуемом стаде оленей из общего числа различных фрагментов (71) не обнаружено ни одного мономорфного – доля полиморфных локусов по обоим маркерам составила 100%. Таким образом, в изученной выборке наибольшее распространение имеют фрагменты средней длины (AG и GA маркеры) и фрагменты минимальной длины (GA маркер). По параметрам, характеризующим изменчивость исследованной популяции оленей, были получены следующие результаты. Среднее число фрагментов у одной особи составило для маркера AG – 13,5, тогда как для маркера GA – 11 фрагментов, причем эти значения достоверно отличаются. Таким образом, в среднем у каждой особи исследованного

А.



Б.

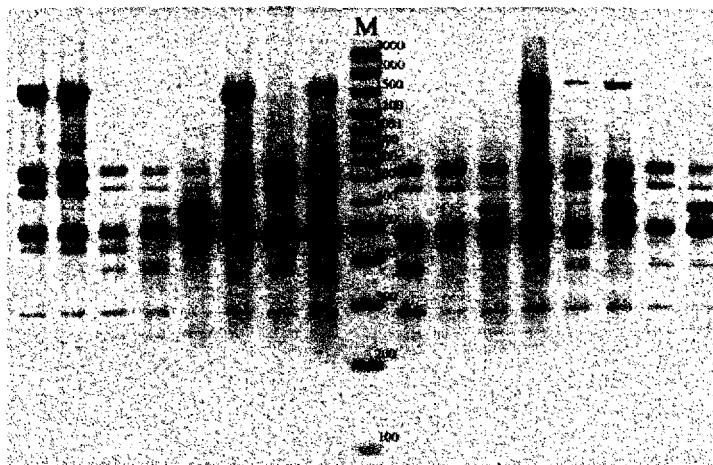


Рис. 5. Разделение продуктов ПЦР амплификации в агарозном геле:

- А. – при использовании праймера (AG)₉C;
- Б. – при использовании праймера (GA)₉C;
- М. – маркер GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus.

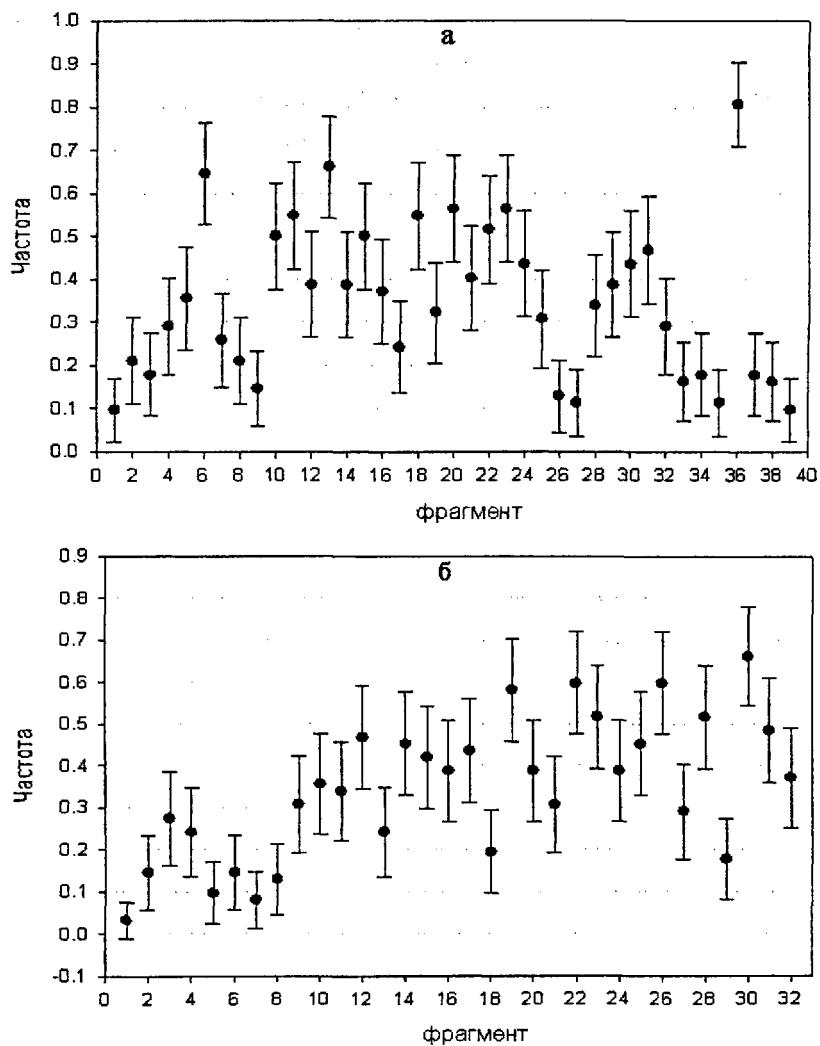


Рис. 6. Профили частот фрагментов различной длины межмикросателлитной ДНК по двум маркерам: AG (а) и GA (б). Вертикальными линиями обозначен 95% доверительный интервал частоты фрагмента.

стада оленей представлено 35% фрагментов маркера AG и 34% фрагментов маркера GA, т.е. приблизительно треть от общего их числа.

Важным показателем, характеризующим изменчивость, является индекс среднего попарного сходства, который для маркера AG имеет значение 0,42, а для маркера GA – 0,40. Полученные значения свидетельствуют о достаточно высоком сходстве паттернов фрагментов у особей исследованного стада оленей, а значит и сайтов локализации соответствующих видов микросателлитных последовательностей в геноме оленей.

Однако, несмотря на относительно высокий уровень сходства особей по исследованным маркерам, значения средней гетерозиготности (по Стефенсу, Stephens *et al.*, 1992) свидетельствуют о значительном генетическом разнообразии соответствующих локусов генома в исследованном стаде оленей: AG – 0,73 и GA – 0,75.

Учитывая, что численность тувинской популяции в последние годы значительно сократилась и популяция, поэтому находится в угрожающем состоянии, необходимо следить за сохранением в ней уровня генетического разнообразия, обеспечивающего устойчивое поддержание популяции.

5. Обсуждение.

Ограничение численности популяции ведет к потере разнообразия, выражющейся, в частности, в потере аллелей. При этом следует ясно представлять различие между общей численностью популяции (N) и её эффективной численностью (N_e), то есть той ее частью, которая передаст генофонд следующему поколению (Алтухов, 1989). В большинстве случаев N_e оказывается меньше N . Принято считать, что эффективная численность в 50 особей представляется достаточной для обеспечения некоторой защиты против происходящей вследствие инбридинга потери жизнеспособности. Эффективная численность в 500 особей является достаточной для защиты от потери генетического разнообразия. Численность в 500 особей часто соответствует общей численности в 2000-5000 особей или более (Nei, Graur, 1984; Soule, 1987; Harris, Allendorf, 1989).

Эффективную численность популяции можно вычислить по Райту (Wright, 1938) из фактического соотношения особей мужского и женского пола:

$$N_e = \frac{4 N_m N_f}{N_m + N_f}; \text{ где}$$

N_e – эффективная численность популяции;
 N_m – число самцов, дающих гаметы для следующего поколения;
 N_f – соответствующее число самок.

На основании этой формулы мы вычислили эффективную численность (N_e) в исследованной в нашей работе популяции Тувы:

В Туве всего: 1200 особей. Обследовано 213, т.е. 17,75%, среди них 10 самцов-производителей, 63 половозрелые самки; тогда во всей популяции:

$$10 \times (100/17,75) = 56,3 \text{ ♂}$$

$$63 \times (100/17,75) = 354,7 \text{ ♀}$$

Отсюда 411 особей участвует в воспроизводстве и эффективная численность:

$$N_e = \frac{4 \times 56,3 \times 354,7}{56,3 + 354,7}$$

$$N_e = \text{194,4}$$

Таким образом, эффективная численность тувинской популяции северного оленя, которая составляет примерно 195, значительно меньше численности в 500 особей, которая, как считают, обеспечивает устойчивое сохранение генетического разнообразия.

Во “Всемирном списке многообразия домашних животных” (WWL-DAD) приводится классификация, основанная на общем популяционном размере, числе разводимых самок и тенденциях в сторону увеличения, уменьшения или стабильности в популяционном размере породы.

Согласно этой классификации тувинская популяция оленей находится ближе всего к статусу “вызывающих опасения”. Вызывающая опасения – это категория, где число разводимых самок колеблется от 100 до 1000, а самцов менее или равно 20, но больше 5, или общий популяционный размер может быть незначительно больше 1000, но при этом численность животных уменьшается, а процент чистопородных самок составляет менее 80% (Столповский, 1997). Все это делает необходимым проведение популяционно-генетических исследований и выработку рекомендаций по сохранению данной популяции.

Для оценки существующего уровня генетического разнообразия в тувинской популяции домашних северных оленей мы применили два метода: изучение полиморфизм мтДНК и ISSR-анализ.

К моменту начала нашей работы была исследована изменчивость мтДНК в популяциях северных оленей Финляндии, Норвегии, Канады, Аляски, Шпицбергена и других островов, а также зарубежными авторами были опубликованы немногочисленные данные, собранные в Европейской части России и на Таймыре. Одна из последних работ была проведена в Монголии (Roed *et al.*, 2006). Восточные и юго-восточные популяции России не были изучены молекулярно-генетическими методами.

В проведенном нами сравнении нуклеотидных последовательностей контрольного региона D-петли мтДНК было показано, что количество вариабельных сайтов равна 3,5% от общего числа нуклеотидов и нуклеотидное разнообразие $p=0,0086\pm 0,00234$, что является показателем генетического разнообразия данной популяции.

Для филогенетического анализа были использованы последовательности из GeneBank, относящиеся к 3 известным гаплогруппам мтДНК. Как видно из рисунка 7, многочисленные образцы из Тувы Tuva-gapl 2, Tuva gapl 1, Tuva gapl 3 кластеризуются отдельно. Некоторые образцы объединяются с образцами из Чукотки и последовательностями GeneBank, которые относятся к образцам из России.

Образцы AY178690 Car20, относящийся к II гаплогруппе, и AY178683 TarN104, относящийся к I гаплогруппе кластеризуются отдельно. По данным (Flagstad, Roed, 2003), гаплогруппа I встречается среди скандинавских популяций северного оленя, II – среди карибу Северной Америки, а гаплогруппа III предположительно имеет восточносибирское происхождение. Большинство наших образцов относятся таким образом к гаплогруппе III, среди них не было выявлено гаплогрупп I и II, что совпадает с предположением о восточно-сибирском происхождении гаплогруппы III. Образцы Tuva-61, Yakutia-gapl 5 образуют на дендрограмме самостоятельный малочисленный кластер, который, возможно, представляет собой, отдельную гаплогруппу.

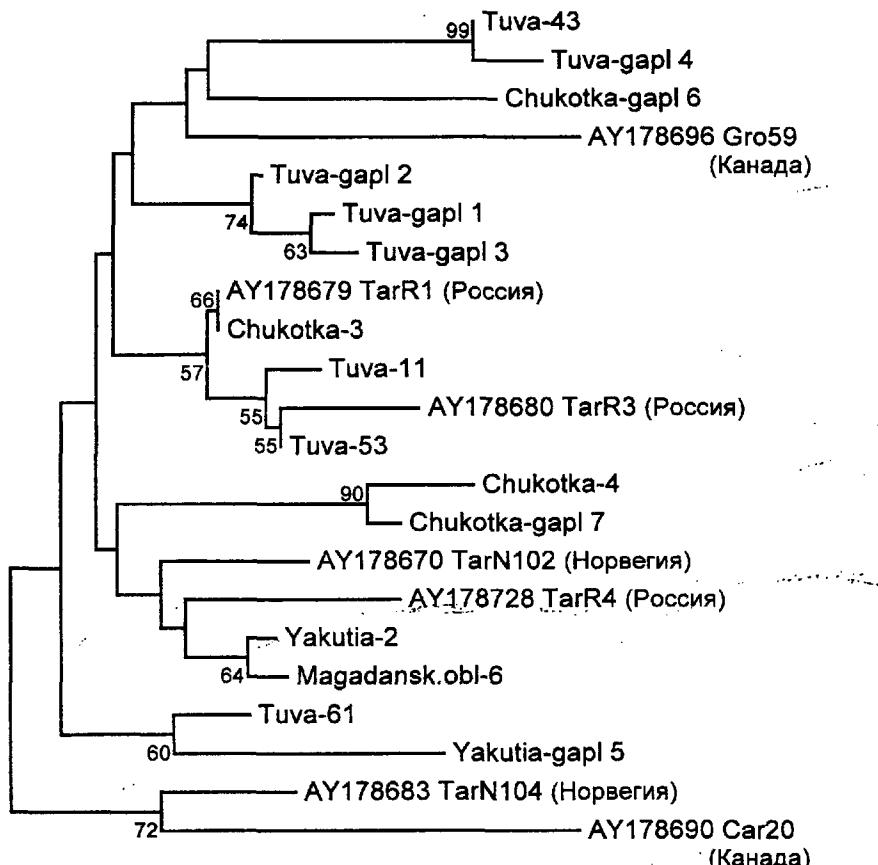


Рис. 7. Дендрограмма сходства последовательностей нуклеотидов D-петли митохондриальной ДНК северных оленей Тувы, Чукотки, Якутии, Магаданской области и образцов из GeneBank. Цифры у ветвей – значение бутсрэп-индекса (500 повторностей). Длина ветвей пропорциональна генетическим дистанциям. Tuva-gap1 1 (Tuva-2, 47, 56, 59, 22, 24, 49, 27, 29, 41, 44, 60, 45, 28, 54, 42, 51, 26); Tuva-gap1 2 (Tuva-46, 48); Tuva-gap1 3 (Tuva-8, 57); Tuva-gap1 4 (Tuva-62, 12, 40); Yakutia-gap1 5 (Yakutia-3, 9); Chukotka-gap1 6 (Chukotka-10, 11); Chukotka-gap1 7 (Chukotka-12, 13, 8). AY178670 TarN102 – *R. t. tarandus*, Норвегия (Snohetta); AY178683 TarN104 – *R. t. tarandus*, Норвегия (Nardandervidda); AY178679 TarR1 – *R. t. tarandus*, Россия (домашний северный олень); AY178680 TarR3 – *R. t. tarandus*, Россия (домашний северный олень); AY178728 TarR4 – *R. t. tarandus*, Россия (домашний северный олень); AY178690 Car20 – *R. t. caribou*, Канада (Квебек); AY178696 Gro59 – *R. t. groenlandicus*, Канада (Северо-Восточные Территории).

МтДНК является важным источником информации о генетическом разнообразии видов. Исследуя изменчивость нуклеотидных последовательностей мтДНК, мы получили картину внутрипопуляционной и межпопуляционной дифференциации северных оленей Тувы, Чукотки, Якутии, Магаданской области. Полученные данные свидетельствуют о достаточно высоком уровне полиморфизма – разнообразия по женским линиям у северных оленей Тувы.

Использованный в работе анализ межмикросателлитного полиморфизма ISSR, оценивающий разнообразие по хромосомным локусам, позволил выявить большее количество фрагментов (71 фрагмент у 62 особей) по сравнению с искусственно разводимыми популяциями, в частности, крупным рогатым скотом (43 фрагмента у 270 особей) (Мохаммад Абади, 2005), что свидетельствует о значительной доле полиморфных локусов в исследуемой популяции.

Также с помощью метода ISSR было подсчитано значение средней гетерозиготности, оказавшееся равным для AG – 0,73 и GA – 0,75. По этому показателю оказалось возможным провести сравнение изученной популяции с популяциями северного оленя, у которых генетическая изменчивость была исследована другими, но дающими сопоставимые результаты, методами изучения микросателлитной ДНК (табл. 2).

Таблица 2. Полиморфизм хромосомной ДНК в тувинской популяции (метод ISSR) в сравнении с генетической изменчивостью по 13 микросателлитным локусам подвидов северного оленя и карibu (Roed, 2005).

Подвид	Популяция	Средний размер выборки на локус	Средняя гетерозиготность
<i>R.t. tarandus</i>	P. Тыва, домашний	62	0,74
<i>R.t. tarandus</i>	Norway, domestic	201	0,73
<i>R.t. tarandus</i>	Norway, wild	181	0,76
<i>R.t. tarandus</i>	Finland, domestic	57	0,77
<i>R.t. fennicus</i>	Finland, wild	33	0,71
<i>R.t. platyrhynchus</i>	Svalbard reindeer	20	0,26
<i>R.t. granti</i>	Alaska caribou	36	0,77
<i>R.t. groenlandicus</i>	West Greenland	18	0,46
<i>R.t. pearyi</i>	Peary caribou	11	0,68
<i>R.t. caribou</i>	Canada, Ontario	13	0,61

При сопоставлении оказалось, что северные олени Тувы сохраняют достаточно высокое значение гетерозиготности, превосходя по этому показателю островные популяции оленей Шпицбергена и Гренландии.

Как было сказано ранее, численность тувинской популяции в последние годы значительно сократилась и популяция находится в состоянии «вызывающем опасения», из чего следует необходимость следить за сохранением в ней уровня генетического разнообразия, обеспечивающего устойчивое поддержание популяции. То, что снижение численности популяции и сопутствующий этому инбридинг, могут иметь самые неблагоприятные последствия, было показано результатами только что проведенных исследований Рёда (Roed *et al.*, 2006) и Хэйга (Haigh *et al.*, 2006) на материале небольшой изолированной популяции северного оленя в Монголии. В изученной нами популяции необходим регулярный мониторинг за состоянием генетического разнообразия с помощью различных генетических маркеров. Использованный в нашей работе метод ISSR, как достаточно простой и информативный, может быть рекомендован для проведения такого мониторинга.

Выполненная нами работа позволяет сформулировать некоторые рекомендации, направленные на устойчивое сохранение поголовья оленей Тувы. Поскольку численность за последние годы упала и достигла минимального за все время учета уровня и популяция приобрела статус “вызывающий опасения”, необходимо не допускать дальнейшего снижения ее численности. Для этого необходимо принятие мер социально-экономического характера, обеспечивающих поддержку оленеводческих хозяйств Тувы.

Представляет интерес провести подобное вышеописанному обследование стад северного оленя в Кая-Хемском и Кызыльском районах Республики Тыва, где популяции домашних северных оленей сохранились в небольшой численности и которые изолированы от основного района оленеводства – Тоджинского района.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Поскольку численность поголовья оленей Тувы упала и достигла уровня 1200 голов, что соответствует статусу “вызывающая опасения”, необходимо не допускать ее дальнейшего снижения. Для этого необходима разработка социально-экономических мер поддержки оленеводческих хозяйств Тоджинского района – главного оленеводческого региона Республики Тыва. В частности можно рекомендовать проведение ветеринарного обучения оленеводов и доставку медикаментов в осенне-весенний период, т.к. именно в этот время происходит наибольший падеж оленей из-за различного рода заболеваний.
2. Необходимо проводить обмен быками-производителями между стадами в пределах района для того, чтобы избежать родственных скрещиваний (инбридинга). Желательно осуществить завоз животных из других таежных регионов оленеводства: оленеводческих хозяйств тофаларов в Иркутской области, сойотов в Республике Бурятия.
3. Необходимо разработать методы криоконсервации спермы северного оленя, создать криобанк генетического материала тувинского северного оленя, в котором будет сохраняться сперма производителей, выдающихся по продуктивности, жизнеспособности и генетическим признакам.

ВЫВОДЫ

1. При изучении нуклеотидной последовательности контрольного региона митохондриальной ДНК тувинской популяции северных оленей в вариабельных областях выявлены в основном транзиции, количество вариабельных сайтов составило 3,5% от общего числа нуклеотидов.
2. В изученной популяции обнаружено 8 митотипов, наиболее многочисленный – один, выявленный у 18 животных из 29.
3. Все митотипы, найденные в тувинской популяции, а также во взятых для сравнения образцах из Чукотки, Якутии, Магаданской области, относятся к гаплогруппе III (по классификации Флагстада и Рёда), свойственной популяциям северного оленя восточносибирского региона.
4. Метод анализа полиморфизма ДНК ISSR-PCR с использованием двух праймеров $((AG)_9C$ и $(GA)_9C$) позволяет охарактеризовать изменчивость 71 хромосомного локуса в популяции северного оленя и может быть рекомендован для проведения мониторинга сохранения генетического разнообразия.
5. Значение средней гетерозиготности (по Стефенсу), по ISSR-локусам в исследованной популяции составило для AG маркера 0, 73 и для GA = 0, 75, что согласуется с аналогичными показателями у других популяций северного оленя, и свидетельствует о сохранении значительного генетического разнообразия в исследованном стаде оленей.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кол Н.В. Генетическая изменчивость митохондриальной ДНК в популяции северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) Республики Тыва // Материалы конференции молодых ученых «Экология: от генов до экосистем», 25-29 апреля 2005 г. Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург. С. 124-129.
2. Кол Н.В., Захаров И.А., Муха Д.В. Полиморфизм митохондриальной ДНК в популяции северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) Тувы // Тезисы докладов Международного рабочего совещания «Происхождение и эволюция биосферы», 26-29 июня 2005 г., Новосибирск. С. 281.
3. Кол Н.В., Королев А.Л., Захаров И.А. Полиморфизм митохондриальной ДНК в тувинской популяции северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) // Генетика. 2006. Т. 42. №1. С. 110-112.
4. Кол Н.В., Лазебный О.Е., Захаров И.А. Изменчивость митохондриальной ДНК и анализ полиморфизма ISSR-PCR маркеров в тувинской популяции северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) // Материалы Международной конференции «Генетика в России и мире», посвященной 40-летию Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, 28 июня-2 июля 2006 г. Москва. С. 94.
5. Kol N.V., Lazebny O.E., Zakharov I.A. Mitochondrial DNA variability and polymorphism of ISSR-PCR markers in the reindeer population of Eastern Siberia // Advances in Deer Biology: Deer in a changing World. Proceedings of the 6th Deer Biology Congress, 7-11 august 2006, Prague, Czech Republic. P. 95.
6. Кол Н.В., Лазебный О.Е. Полиморфизм ISSR-PCR маркеров в тувинской популяции северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) // Генетика. 2006. Т. 42. №12. С. 1731-1734.

Принято к исполнению 08/11/2006
Исполнено 09/11/2006

Заказ № 903
Тираж: 100 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»
ИИН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(495) 975-78-56
www.autoreferat.ru

