

УДК 575.174.015.3:599.745.3(262.81)

О ГЕНЕТИЧЕСКОМ ПОЛИМОРФИЗМЕ КАСПИЙСКОГО ТЮЛЕНЯ (*PUSA CASPICA* GMELIN, 1788) ПО ДАННЫМ ИЗМЕНЧИВОСТИ ФРАГМЕНТА ГЕНА ЦИТОХРОМА В

Олейников Е.П., Кондаков А.А.

*Институт аридных зон Южного научного центра Российской академии наук, Ростов-на-Дону,
e-mail: euginol@mail.ru*

На данный момент сложилась ситуация, когда внимание к изучению внутривидового полиморфизма каспийского тюленя (*P. caspica*) с использованием молекулярно-генетических маркеров недостаточно. Проведение внутривидового сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генетического локуса цитохрома b мтДНК может восполнить пробел в оценке степени полиморфности популяции каспийского тюленя. Поэтому в исследовании предпринята попытка выявить наличие внутривидового полиморфизма каспийских тюленей с использованием молекулярно-генетических и морфологических маркеров, и сопоставить полученные результаты с условиями обитания вида. На основании прямого секвенирования локуса гена цитохрома b мтДНК нами было проведено исследование для определения степени генетического разнообразия популяции *P. caspica*. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей локуса *cyt b* мтДНК показал относительно высокую степень внутривидового полиморфизма *P. caspica*. Исходя из того, что тюлени размножаются в различных районах Каспия, весьма отличающихся по климатическим условиям, мы предположили наличие полиморфизма в популяции каспийского тюленя. А проведенные исследования генетического полиморфизма участка локуса *cyt b* мтДНК, позволяют утверждать, что популяция каспийского тюленя полиморфна генетически.

Ключевые слова: каспийский тюлень, генетический полиморфизм, цитохром b, транзиция, трансверсия

ABOUT THE GENETIC POLYMORPHISM OF THE CASPIAN SEAL (*PUSA CASPICA* GMELIN, 1788) ACCORDING TO VARIATION GENE FRAGMENT OF CYTOCHROME B

Oleinikov E.P., Kondakov A.A.

*Institute of arid zones Southern scientific center of the Russian academy of sciences, Rostov-on-Don,
e-mail: euginol@mail.ru*

It is clear intraspecific polymorphism of Caspian seal is little known. An intrapopulation comparative analysis of nucleotide sequences of genetic locus of cytochrome b of mtDNA might fill the gap in assessment of extend of polymorphism in population of Caspian seal. So, the aims of current study were reveal intraspecific polymorphism of Caspian seal using molecular-genetic and morphological markers and confront received data with habitat. Extend of polymorphism in population of Caspian seal using method direct sequences of genetic locus of cytochrome b of mtDNA were revealed. Analyses of nucleotide sequences of genetic locus of cytochrome b of mtDNA showed high extend of intraspecific polymorphism of Caspian seal. Our hypotheses about intraspecific polymorphism of Caspian seal based on fact that Caspian seal breeding in different areas of Caspian Sea. And current study revealed population of Caspian seal was genetic polymorphism.

Keywords: Caspian seal, genetic polymorphism, cytochrome b, transition mutation, replacement mutation

Представленный в исследовании вид лаастоногих имеет различные взаимодействия с окружающей средой, и подвержен влиянию относительно замкнутой (для него «островной») экосистемы Каспийского моря. Рассматривая пространственную и временную динамику популяции каспийского тюленя возможно традиционное выделение ряда особенностей. В литературных источниках, для популяции этого вида указывается регулярная сезонная миграция по Каспийскому морю: для размножения в северную часть моря, а на время периода активного питания

(нагула) – в центральную или южную, которые обладают различными климатическими и гидрологическими условиями [2]. Причем северная и центральная части моря находятся в умеренном климатическом поясе, а южная уже относится к субтропическому. Также рельеф дна в этих частях Каспия имеет значительно различающийся профиль и батиметрию. Размножение *P. caspica* традиционно отмечается на льдах северного Каспия, но оно происходит на островах, а так же и на некоторых участках берега в его южной части [3, 4].

Таблица 1

Митотипы (генетического локуса *cytb* мтДНК) исследованных образцов

Нуклеотидная позиция в RS	14663	14686	14730	14792	14801	14582	14921	14933
Reference sequence	A	T	T	G	C	A	C	C
<u>Mitotype 9*</u>	G	T	T	A	C	A	C	C
Mitotype 10	G	T	T	G	T	G	C	C
Mitotype 11	A	A	C	G	C	A	C	C
Mitotype 16	G	T	T	G	C	G	C	T
Mitotype 17	A	T	C	G	C	A	A	C
<u>Mitotype 18*</u>	G	T	T	A	C	A	C	C
<u>Mitotype 24●</u>	A	T	C	G	C	A	C	C
Mitotype 27	G	T	T	G	C	G	C	C
<u>Mitotype 28●</u>	A	T	C	G	C	A	C	C
<u>Mitotype 29*</u>	G	T	T	A	C	A	C	C

Несмотря на частое использование в филогенетических исследованиях ластоногих, основанных на изучении нуклеотидных последовательностей [9] к концу 2014 г. в GenBank находилась информация о четырех нуклеотидных последовательностях генетического локуса цитохрома *b* мтДНК *Phoca caspica*. Это наглядно демонстрирует недостаточное внимание к изучению внутривидового полиморфизма с использованием молекулярно-генетических маркеров. Проведение внутривидового сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генетического локуса цитохрома *b* мтДНК может восполнить пробел в оценке степени полиморфности популяции каспийского тюленя.

В соответствие с этим нами была поставлена цель: установить наличие внутривидового полиморфизма каспийских тюленей с использованием молекулярно-генетических и морфологических маркеров, и сопоставить полученные результаты с условиями обитания вида. На основании прямого секвенирования локуса гена цитохрома *b* мтДНК нами было проведено исследование для определения степени генетического разнообразия популяции *P. caspica*.

Материалы и методы

Экстракцию ДНК проводили из образцов покровных тканей падших особей, найденных на побережье северо-западной

и западной части Каспия. Всего были рассмотрены образцы от 10 особей собранных нами и одна референтная последовательность из GenBank. ДНК экстрагировалась из тканей с использованием стандартной процедуры лизиса гомогенатов тканей в 50 мМ растворе Трис-НСl буфера, рН=8.0, содержащем 10 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, 1% SDS, 50 мМ дитиотрейтол и протеиназу К (0.5 мкг/мл) в течение 2-4 часов при 37° ДНК экстрагировали стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Затем образцы ДНК преципитировали в этаноле.

Генотипирование образцов проводили с использованием стандартного набора праймеров L14841 [5'-AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3'] и H15149 [5'-AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3'] к генетическому локусу цитохрома *b* мтДНК [8]. Амплификацию ДНК-локусов осуществляли на термоциклере Bio-Rad C1000 Touch (38 циклов).

Первичный анализ и элайнмент нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы BioEdit Sequence Alignment Editor версии 7.0.5.3 [6]. Выраженность отличий первичных нуклеотидных последовательностей исследованного генетического локуса определялись с использованием параметрической модели Kimura-2 [7] и графически представлялись в виде ME-кладограммы.

Результаты исследования и их обсуждение

Известные молекулярно-генетические исследования каспийского тюленя констатируют, что популяция имеет относительно низкий уровень генетического полиморфизма в пределах традиционных локусов молекулярно-генетических исследований. По сути, основная идея исследований генетического разнообразия вида была направлена на определение места, времени и степени расхождения его от близкородственных видов ластоногих, а не на его внутривидовую структуру. Рассмотрение классических морфометрических параметров А.А. Аристовым и Г.Ф. Барышниковым [1] достаточных предпосылок для выделения внутри вида субпопуляционных структур не дали.

На основании прямого секвенирования локуса гена цитохрома *b* мтДНК нами было проведено установление степени генетического разнообразия популяции *P. caspica*.

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей локуса *cyt b* мтДНК показал относительно высокую степень внутривидового полиморфизма *P. caspica*. Из 11 митотипов, проанализированных нами, 8 оказались уникальными.

Высокополиморфные сайты приводятся ниже:

1.	14663 A→G	транзигия
2.	14686 T→A	трансверсия
3.	14730 T→C	транзигия
4.	14792 G→A	транзигия
5.	14801 C→T	транзигия
6.	14852 A→G	транзигия
7.	14921 C→A	трансверсия
8.	14933 C→T	транзигия

Таким образом, среди рассмотренных образцов были отмечены следующие точечные мутации: в 75% случаев - это транзигии (мутация замены оснований, когда одно пуриновое основание замещается на другое

(аденин на гуанин или наоборот), либо пиримидиновое основание на другое (тимин на цитозин или наоборот), а в 25% случаев – это трансверсии (мутация замены оснований, когда одно пуриновое основание замещается на пиримидиновое или наоборот). Делеций (хромосомные перестройки, при которых происходит потеря участка хромосомы) и инсерций (хромосомные перестройки, при которых происходит вставка участка хромосомы) в пределах изученной выборки обнаружено не было.

Митотипы (генетического локуса *cyt b* мтДНК) исследованных образцов демонстрируют наличие среди них двух повторяющихся (Табл. 1).

Список литературы

1. Аристов А.А., Барышников Г.Ф. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Хищные и ластоногие. – СПб: СПбГУ, 2001. – 560 с.
2. Бадамшин Б.И. Рыбные ресурсы водоемов Казахстана и их использование. – Алма-Ата: Изд-во Наука казахской ССР, 1966. – С. 94-124.
3. Крылов В. И. Особенности биологии каспийских тюленей южного Каспия. – Архангельск, 1986. – С. 220-221.
4. Лисицына Т.Ю. Портреты зверей Северной Евразии. Ластоногие. – М.: Изд-во Центра охраны дикой природы, 2015. – 264. с.
5. Олейников Е.П., Кондаков А.А. Краниометрия и неметрические особенности черепов каспийского тюленя (*Pusa caspica*) //Териофауна России и сопредельных территорий: мат-лы международного совещания (Москва, 1-4 фев., 2011). – М: КМК Scientific Press, 2011. – С. 343.
6. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series. – 1999. – P. 95-98.
7. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Mol. Evol. – 1980. – V. 2. – P. 111-120.
8. Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Paabo S., Villablanca F.X., Wilson A.C. // Proc. Nati.Acad.Sci. USA. – 1989. – V.86. – P. 6196-6200.
9. Fulton T.L., Strobeck C. Multiple fossil calibrations, nuclear loci and mitochondrial genomes provide new insight into biogeography and divergence timing for true seals (Phocidae, Pinnipedia) // Journal of Biogeography. – 2010. – V. 37. – P. 814-829.