

УДК: 575.1:577

МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ МАРКЕРИ ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ ПОПУЛЯЦІЙ ПІНГВІНІВ ДЖЕНТУ (*Pygoscelis papua*) З АНТАРКТИЧНОГО ПІВОСТРОВА

А.С. Драницина^{1,2}, Г.Д.Телегеев², М.В. Дибков²,
І.Н.Чумаченко¹, В.Ф. Безруков¹

¹Національний університет ім. Тараса Шевченка, Проспект Глушкова 2, Україна, 01033, e-mail: alevtinka@inbox.ru.

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України Київ, вул. Заболотного, 150, Україна, 03143.

Реферат. Проведено оцінку молекулярно-генетичного поліморфізму особин ослиного пінгвіна – дженту (*Pygoscelis papua*) за маркерами RAPD та визначено максимальну (приблизно 9000 п.н.) і середню довжину теломер особин пінгвінів даного виду приблизно 6300±1256 п.н. для дорослих особин та 8100±828,4 п.н. для пташенят.

Молекулярно-биологические маркеры для анализа генетического разнообразия популяций пингвинов дженту (*Pygoscelis papua*) с Антарктического полуострова. А.С.Драницина, Г.Д.Телегеев, М.В. Дибков, И.Н.Чумаченко, В.Ф. Безруков

Реферат. Проведена оцінка молекулярно-генетичного поліморфізму особей ослиного пінгвіна – дженту (*Pygoscelis papua*) по маркерам RAPD і определена максимальная (приблизительно 9000 п.н.) и средняя длина теломер особей пингвинов этого вида приблизительно 6300±1256 п.н. для взрослых особей и 8100±828,4 п.н. для птенцов.

Molecular-biological markers for analysis of Gentoo penguin's (*Pygoscelis papua*) genetic diversity from Antarctic Peninsula. A.S.Dranitsina, G.D.Telegeev, M.V.Dybkov, I.N.Chumachenko, V.F.Bezrukov

Abstract. The estimation of genetic polymorphism of Gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) by RAPD markers has been carried out. RAPD analysis was used to examine the extent of genetic polymorphism in two populations of Gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) from Antarctic Islands (Petermann and Livingston). RAPD-PCR analysis was carried out as the modified method of Operon. A series of random primers 10 bp each has 60-70% GC contents (OPA, OPM, OPP (Operon Technologies, Alameda, CA, USA)) (Mishta et al. 2002) and an original primer (11 mer) were used for RAPD analysis. For obtaining probes with (TTAGGG)_n repeat the corresponding oligonucleotide (TTAGGG)₃ and complementary them oligonucleotide (TAACCC)₃ were synthesized. The primers were prepared for annealing and then ligated into pUC19 plasmid vector. The cloned fragment (450 bp.) was labeled with [α -P32]-dCTP and DIG (digoxigenin) using forward and reverse standard primers in a polymerase chain reaction.

The chosen three 10 mer oligonucleotide primers accordingly to preliminary results showed different levels of polymorphism in Gentoo penguins at Petermann Island (from 22,6% до 42,9%) and Livingston Island (from 41,3% до 57,1%). Nei's similarity coefficients were in range from 0,561 (when Gentoo genome profiles were compared with RAPD profiles of two related penguin species: *Pygoscelis adeliae* (Adelie) and *Pygoscelis antarctica* (Chinstrep)) to 0,928 among observed Gentoo penguin populations. Nei's distances values ranged from 0,075 to 0,579 among the populations and species. Accordingly to the obtain results it was proved that the examined populations belong to the same subspecies *Pygoscelis papua ellsworthi*.

We determined the maximum (approximately 9000 bp) and the mean telomere length of Gentoo penguins approximately 6300±1256 bp for adult specimens and 8100±828,4 bp for chicks.

Key words: Gentoo penguin, RAPD, telomeres, DIG, genetic polymorphism.

1. Вступ

Пінгвіни – це важлива складова антарктичної екосистеми, і на сьогоднішній день дослідження їх біології є однією з визначальних проблем фундаментальних антарктичних досліджень міжнародних спільнот, досліджень, що стосуються проблем розповсюдження видів та їх генетичної мінливості (deYoung et al., 2004; Metcheva et al., 2006). Однак у спеціальній літературі мало даних про генетичний поліморфізм різних популяцій пінгвінів дженту (ослині пінгвіни – дженту (*Pygoscelis papua*), їх міграції, незважаючи на важливе значення для екосистеми Антарктичного півострова. Проведена робота присвячена дослідженню генетичної мінливості особин пінгвінів дженту за допомогою маркерів RAPD та, як окреме завдання, визначенню довжини теломер пінгвінів дженту з огляду на те, що вік є надзвичайно важливим у визначенні функціонального стану організму та його відповіді на вплив навколишнього середовища.

2. Матеріали та методи

Зразки крові пінгвінів було зібрано на острові Пітерманн поблизу Української антарктичної станції «Академік Вернадський», яка знаходиться на острові Галіндез, у районі півострова Антарктичний та острові Лівінгстон (поблизу Болгарської антарктичної станції «Святий Климент Охридський», Південні Шетландські острови). Виділення ДНК йшло з використанням 2-х методів: 1) стандартної фенол – хлороформної екстракції (Маниатис і др., 1984); 2) виділення ДНК із застосуванням NaCl (Малюта і др., 1996).

RAPD-аналіз проводили за запропонованими фірмою «Operon Ltd» та частково модифікованими параметрами для встановлення оптимальних умов отримання RAPD-спектрів. Для RAPD-ПЛР було використано наступні послідовності випадкових праймерів, які давали стабільні поліморфні спектри: OPP – 12 – AACGGCGAGT, OPM – 02 – ACAACGCCTC, OPA – 10 – GTAATCGCAG (Mishra et al., 2002) та 11-mer – GGTGGGCTGGA. Розділення продуктів ампліфікації проводили електрофоретично при 5–10 В/см (Маниатис и др., 1984). RAPD-профілі були проаналізовані за допомогою RFLP Scan 3.12. (Scanalytics). Коефіцієнти генетичної подібності Нея та значення поліморфізму були розраховані, використовуючи POPGENE version 1.32 (Yeh F. C. et al., 1999). Вірогідність відмінностей за середніми вищенаведеними даними було розраховано за допомогою пермутаційного тесту, а їх значення визначали при $P < 0,05$ (Семенова и др., 2002). Усі обрахунки на основі бінарних матриць генетичних дистанцій були проведені, використовуючи пакет PHYLIP, версія 3.63.

Для визначення довжини теломер пінгвінів було проведено лігування теломерних повторів, їх клонування у плазмідний вектор pUC19, перенесення за Саузерном (Маниатис и др., 1984) геномної ДНК пінгвінів і гібридизацію з радіоактивно-міченим зондом [α -P32]-dCTP (Малюта и др., 1996) та зондом на основі дігуксигеніну. Одержані рентгенівські плівки були проаналізовані за допомогою RFLP Scan 3.12. (Scanalytics). Математичну та статистичну обробку результатів досліджень проводили на комп'ютері з використанням програмного пакету GrafPad Prism 4.03 (GrafPad Software Inc., США). Отримані дані тестувались на нормальне розподілення за допомогою тесту Колмогорова–Смірнова та на достовірність різниці варіабельностей між вибірками за допомогою F-тесту. Значення $p < 0,05$ було прийнято як вірогідне. Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою непарного параметричного t-тесту, було обраховано значення середнього арифметичного та середньоквадратичне відхилення – дисперсія - (SD).

3. Результати та обговорення

3.1. RAPD-аналіз

RAPD-аналіз був використаний для дослідження рівня генетичного поліморфізму двох популяцій пінгвінів дженту (*Pugoscelis raru*) з Антарктичних островів (Пітерманн та Лівінгстон) (рис.1).

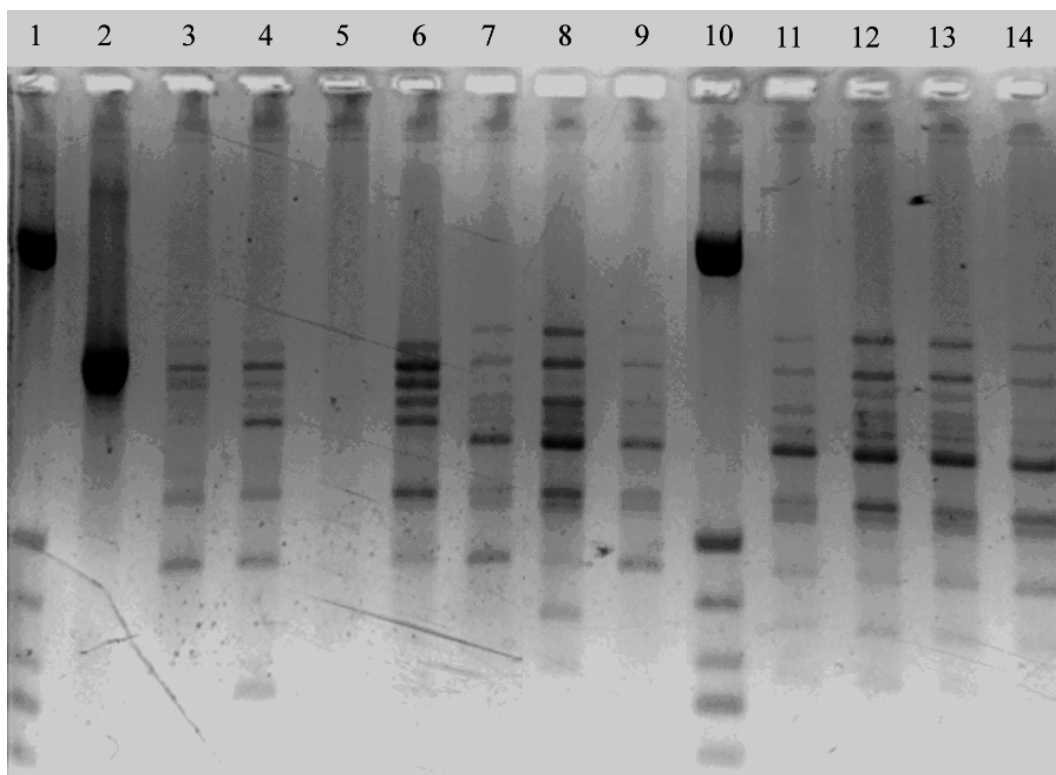


Рис. 1. Електрофореграма розділення продуктів RAPD-ПЛР за зразками ДНК різних видів пінгвінів (праймер OPM – 02).

1, 10 – маркер молекулярної маси – плазміда pUC19, розщеплена ферментом MvaI, та плазміда pUC19, розщеплена ферментом MspI; 2 – позитивний контроль ПЛР – фрагмент розміром 890 п. н.; 3 – ДНК пінгвінів Аделі; 4,6 – ДНК бородатих пінгвінів; 5 – негативний контроль ПЛР; 7–9 – ДНК пінгвінів дженту (о. Пітерманн); 11–14 – ДНК пінгвінів дженту (о. Лівінгстон).

Відібрані чотири десятичленні олігонуклеотидні праймери за попередніми результатами виявили різні рівні поліморфізму пінгвінів дженту о. Пітерманн (від 22,6% до 42,9%) та о. Лівінгстон (від 41,3% до 57,1%).

Коефіцієнти попарної подібності Нея - S варіювали від 0,561 (при порівнянні геномних профілів пінгвінів дженту з пінгвінами Аделі – *P. adeliae* (Adelie) та бородатими пінгвінами – *P. antarctica* (Chinstrep) (рис.1)) до 0,928 між обстеженими популяціями пінгвінів дженту. Генетичні дистанції Нея - D були від 0,075 до 0,579 між популяціями та видами. Обчислене середнє значення F_{st} за обрахованими значеннями S та D у популяціях пінгвінів дженту дорівнювало 0,069, це свідчило, що приблизно 6,9% генетичного поліморфізму є наслідком міжпопуляційних диференціацій, які були незначними (Roeder et al., 2001). Також відповідно до одержаних результатів за допомогою RAPD-аналізу на пінгвінах дженту з двох островів Антарктики можна підтвердити, що ці дві популяції належать до одного й того ж підвиду (*Pygoscelis papua ellsworthi*) (Savov et al., 2004). Праймер ОРМ-02 у порівнянні з праймером ОРА-10 при аналізі особин двох видів виявив вищий рівень поліморфізму (переважно характерний для міжвидового рівня мінливості) – коефіцієнти генетичної подібності Нея $0,3 < S < 0,6$ (Васильев и др., 2002).

3.2. Визначення довжини теломер

Середня виявлена довжина теломер пінгвінів дженту (використовуючи радіоактивно-мічений зонд [α -P32]-dСТР) становила приблизно 8000 п.н. Така довжина теломер виявилась характерною як для дорослих птахів, так і для пташенят пінгвінів дженту. При подальшому визначенні довжини теломер пінгвінів дженту за допомогою гібридизації із зондом на основі дігуксигеніну (DIG) було отримано наступні результати: середня встановлена довжина теломер дорослих особин пінгвінів дженту ($n=15$) становила приблизно 6300 ± 1256 п.н., коефіцієнт варіацій – 19,9%, довірчий інтервал значень S при $P > 0,05$ (5577–7027), пташенят ($n=16$) – $8100 \pm 828,4$ п.н., коефіцієнт варіацій – 10,2%, довірчий інтервал значень S при $P > 0,05$ (7612–8613).

Максимальна довжина теломер, виявлена в пташенят, дорівнювала близько 9000 п.н., мінімальна – 6500 п.н. У дорослих птахів – 8000 п.н. та 4600 п.н. відповідно (рис. 2).

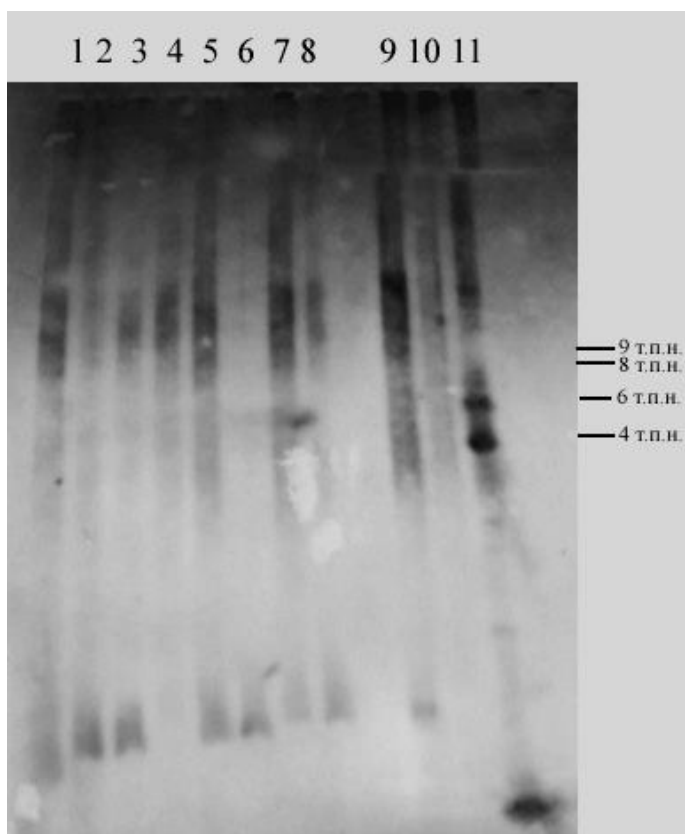


Рис. 2. Саузерн блотинг для визначення довжини теломер пінгвінів дженту (зонд на основі дігуксигеніну) 1-6 – ДНК пінгвін дженту (дорослі особини); 7-8, 9-10 – ДНК пінгвінів дженту (пташенята); 11 – плазміда рUC19 із клонованими теломерними повторами (молекулярний маркер – 6,0 т.п.н.)

Розподіл довжини теломер у дорослих птахів та пташенят пінгвінів дженту вірогідно відрізнявся $P=0,0002$.

Такі ж довжини теломер, притаманні дорослим пінгвінам, можна пояснити або відносно невеликим віком обстежених дорослих птахів (як це було показано Хауссманом на особинах пінгвінів Аделі із чітко визначеним віком (Hausmann et al., 2003)), або тим, що довжина теломер, як визначник віку, є перспективним напрямком, але не без проблем. Існує значна варіація у довжині теломер серед особин одного віку досить великої кількості видів птахів. Тому можна зробити висновок, що довжина теломер корелює з хронологічним віком, але не завжди надійно його визначає (Nakagawa et al., 2004). Одержані нами дані можуть бути порівняні з відповідними, отриманими під час визначення довжини теломер пінгвінів Аделі: довжина теломер цих птахів становила 9500 п.н. (Hausmann et al., 2003).

Одержані результати можуть бути використані для подальших досліджень природних популяцій пінгвінів дженту з огляду на дослідження розповсюдження особин даного виду в Антарктиці.

Висновки

1. У роботі проведено оцінку молекулярно-генетичної мінливості (поліморфізму) особин пінгвінів дженту (*Pygoscelis pappua*) маркерами RAPD.
2. На основі RAPD-аналізу було показано переважно середній рівень поліморфізму між особинами пінгвінів дженту о. Пітерманн та переважно високий рівень поліморфізму між особинами пінгвінів о. Лівінгстон. Коефіцієнти попарної подібності Нея – від 0,561 до 0,928 для досліджуваних видів та популяцій пінгвінів. Значення генетичних дистанцій Нея – від 0,075 до 0,579 між особинами вищезазначених популяцій та видів птахів.
3. Визначено максимальну (приблизно 9000 п.н.) та середню довжину теломер пінгвінів дженту: приблизно 6300 ± 1256 п.н. для дорослих особин та $8100 \pm 828,4$ п.н. для пташенят.

Література

1. **Васильев В. А.**, Стекленин Е. П., Морозова Е. В., Семенова С. К. ДНК-фінгерпринтинг представителів окремих видів, міжродових і міжвидових гібридів родів *Bos* і *Bison* підсемейства Bovinae // 2002.– №38 – С.515–520.
2. **Малюта С. С.**, Дыбков М. В., Телегеев Г. Д. Изучение полиморфизма ДНК жителей Украины, выявляемого зондом на основе фага M13 //1996.– №30.– С.31–35.
3. **Маниатис Т.**, Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии //1984.– 480 с.
4. **Семенова С. К.**, Иларионова Н. А., Васильев В. А. Генетический анализ и оценка генетического разнообразия восточноевропейских пород борзых собак (*Canis Familiaris* L.) по данным RAP - маркирования генома //2002.– №38.– 842–852.
5. **deYoung B.**, Heath M., Werner F. et al. Challenges of modeling ocean basin ecosystems // *Science*.– 2004.– V.304.– №5676.– P.1463–1466.
6. **Hausmann M. F.**, Winkler D. W., O'Reilly K. M. et al. Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones // *Proc Biol Sci*.– 2003.– V.270.– №1522.– P.1387–1392.
7. **Metcheva R.**, Yurukova L., Teodorova S., Nikolova E. The penguin feathers as bioindicator of Antarctica environmental state // *Sci Total Environ* .– 2006.– V.362.– №(1–3).– P.259–265.
8. **Mishra M.**, Dubey N., Totey S. M. et al. Phylogenetic relationships and genetic polymorphisms in wild Indian mice // *Biomol Eng*.- 2002.- V.18.- №6.- P.281-288.
9. **Nakagawa S.**, Gemmel N. J., Burke T. Measuring vertebrate telomeres: applications and limitations // *Mol Ecol* .– 2004.– V.13.– №9.– P.2523–2533.
10. **Roeder A. D.**, Marshall R. K., Mitchelson A. J. et al. Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adelie penguin colonies around Antarctica // *Mol Ecol*.– 2001.– V.10.– №7.– P.1645–1656.
11. **Savov A. S.**, Telegeev G. D., Bichev S. N. et al. Sex identification of Gentoo penguins using PCR with specific primers //2004.– С.166.
12. **Yeh F. C.**, Boyle T., Yang R. C. et al. POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis, version 1.31 // University of Alberta and Centre for International Forestry Research.– 1999.– P.102–120.