## **КРАТКИЕ СООБШЕНИЯ**

УДК 636.01;599.735.31;575

## РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ Rangifer tarandus

© 2021 г. И. В. Артюшин<sup>1, 2</sup>, Е. А. Коноров<sup>1, 3, \*</sup>, К. А. Курбаков<sup>1, 3</sup>, Ю. А. Столповский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия <sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия <sup>3</sup>Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук, Москва, 109316 Россия

\*e-mail: casqy@yandex.ru
Поступила в редакцию 24.01.2020 г.
После доработки 05.08.2020 г.
Принята к публикации 03.09.2020 г.

Разработана система праймеров и оптимизированы условия ПЦР для амплификации митохондриального генома северного оленя *Rangifer tarandus*. Получены последовательности полного митохондриального генома домашнего и дикого оленя из Ненецкого автономного округа. Сравнение двух данных геномов с уже известными двумя митохондрионами домашних оленей из Китая и Японии выявило всего 160 полиморфных сайтов во всех этих выборках. Обнаружены уникальные аллели как для диких, так и домашних оленей Ненецкого автономного округа. Таким образом, разработанная методика позволяет получить новую информацию для филогеографии и изучения генетического разнообразия пород северного оленя, охватывая изменчивость по неизученным для северного оленя митохондриальным маркерам, таким как ND1—ND6 и ATP6, ATP8.

Ключевые слова: Rangifer tarandus, митохондриальный геном, полиморфизм.

**DOI:** 10.31857/S0016675821010033

Генетике северного оленя Rangifer tarandus посвящено множество исследований, затрагивающих проблемы консервации географических популяций [1, 2], определения потока генов между дикими и домашними формами [3, 4], генетического разнообразия отдельных пород и популяций [5, 6]. В большинстве работ использовались микросателлитные маркеры, либо отдельные регионы митохондриального генома.

Участки митохондриального генома широко используются в качестве маркеров для филогенетики и баркодинга, а также для изучения внутривидовой изменчивости. Для такого рода исследований мтДНК очень удобна из-за ее высокой копийности, что улучшает успешность амплификации при небольшом количестве ДНК. Последовательность генов в митохондрионе консервативна у животных, что облегчает подбор и использование праймеров для разных групп животных. В то же время в мтДНК есть достаточное количество замен для определения различий как особей внутри вида, так и на уровне семейств. Особенно при использовании маркеров с разной скоростью накопления замен, таких как первая субъединица цитохромоксидазы (COI) и D-петля. Несмотря на обнаруженные недостатки – отклонение от нейтральности, отклонения в скоростях эволюции у отдельных таксонов, ядерные копии митохондриальных генов [7], а также на увеличение доли исследований, использующих полногеномное секвенирование — мтДНК не утратила своей роли одного из основных маркеров в популяционной генетике.

Большинство популяционно-генетических исследований северного оленя проводилось на единичном маркере, в основном D-петле контрольного региона, cytb, COI или COII, либо на комбинации из приведенных маркеров [3-9]. Использование полных митохондриальных геномов же позволяет объединить гаплотипы отдельных маркеров в единые гаплогруппы митохондрионов, сократив их количество, и дополнить информацией о полиморфизме неизученных участков мтДНК. Использование полных митохондриальных геномов позволило прояснить происхождение отдельных линий крупного рогатого скота и с большим разрешением уточнить их популяционную историю [10, 11]. В настоящее время известны митохондрионы двух северных оленей - эвенкийского оленя из Аолугуя, Китай [12, GenBank KM506758.1] и оленя из Хоронобе, Япония (Wada et al., неопубликованные данные, GenBank AB245426.1). В данных работах были использованы праймеры для Arborophila ruL 1324

L 2915

L 8328

L 10802

L 15394

типость амплификации для хорошо сохранившенся и деградировавшей мідтік										
Позиция начала праймера	Последовательность	Позиция начала праймера	Последовательность обратного праймера	% амплификации из свежих проб $(n=24)$	% амплификации из проб деградировавшей ДНК $(n=120)$	Температура, °С				

gttggcccagttcagcacggattagt

ggggcaaggcttgagtggtaaaatgc

agtggtggggttggttgtggaattgt

ctggggtgtagttgtctgggtctcct

gctcgtctggtttcggggtacttagc

R 5458

R\_8934

R 13977

R 14930

R 1349

**Таблица 1.** Разработанная система праймеров для амплификации полного митохондриона *R. tarandus* и эффективность амплификации для хорошо сохранившейся и деградировавшей мтДНК

fipectus и сычуаньской куропатки [13], что может затруднить их использование для популяционногенетических исследований с использованием высокопроизводительного секвенирования из-за недостаточной специфичности. Поэтому нами была разработана система праймеров для амплификации мтДНК для последующего секвенирования.

gctaagtaccccgaaaccagacgagc

gccattacgacctgccacatcctcaa

acaccegetecattaatteceatget

ggccttcacctctgactacccaaagc

tcaacacccaaagctgaagttctaatt

Мы разработали систему из пяти пар праймеров (табл. 1) и опробовали ее на 120 образцах выщипов с относительно деградировавшей ДНК (условия хранения: температура  $0-10^{\circ}\mathrm{C}$ , срок хранения 1-2 года), и 24 образца из свежезамороженных образцов. Для фрагментов  $L_2915$ - $R_8934$  и  $L_8328$ - $R_13977$  амплификация произошла только в половине свежих образцов и в четверти образцов с деградировавшей ДНК, скорее всего, из-за большей длины (5649 и 6019 пн соответственно). Объем смеси для ПЦР составил 25 мкл, из них: 2 мкл —  $10\times$  Encyclo буфер (Encyclo Plus PCR kit, Евроген, Россия), 0.4 мкл dNTP  $50\times$ , 0.4 мкл Hot Taq-полимераза  $50\times$ ,  $2\times$  0.04 мкл праймеры, 17.12 мкл dd  $H_2O$  и 5 мкл экстракта ДНК образца.

Два образца дикого и домашнего оленя из Ненецкого автономного округа были отсеквенированы на платформе Illumina Mi Seq. Полученные чтения были выровнены на геном оленя из Хоронобе с помощью bowtie 2 [14] и собраны, используя известный геном в качестве референса. Последовательности митохондриального генома дикого и домашнего оленя из Ненецкого автономного округа депонированы в базе данных GenBank под идентификаторами МТ753444 и МТ726040 соответственно. Полученные нами митохондриальные геномы были выровнены с геномами северных оленей из Аолугуя и Хоронобе, а также с геномом Cervus elaphus (GenBank KP172593.1) с помощью MAFFT [15]. Также были получены из базы данных GenBank данные по отдельным митохондриальным маркерам: COI, cytb, контрольному региону [9, 16—20], и выровнены отдельно для каждого маркера. Подсчет числа полиморфных сайтов и нуклеотидного разнообразия осуществлялся с помощью DnaSP [21].

100

50

62.5

95.8

100

83.3

22.7

20.8

87.5

100

62.7

62

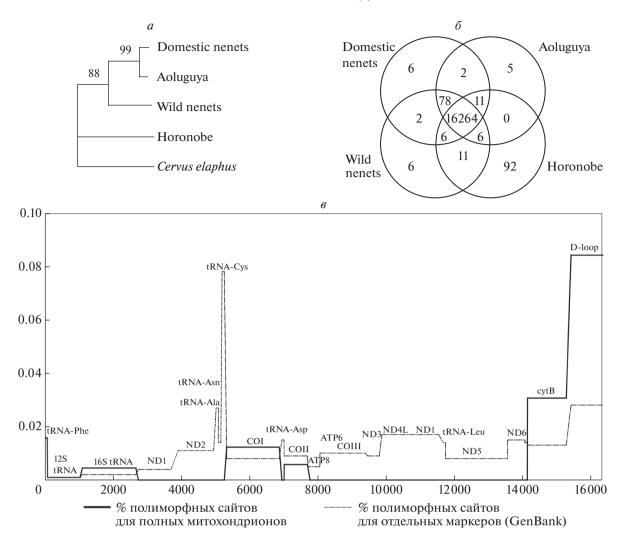
64

64

55.9

Филогенетический анализ полных митохондрионов R. tarandus с помощью Mr. Bayes выявил родство домашнего оленя из Ненецкого AO и эвенкийского оленя из Аолугуя (рис. 1,a). Геном оленя из Хоронобе находится дальше от остальных митохондрионов, однако обладает общими аллельными вариантами с диким оленем из Ненецкого AO в 11 полиморфных сайтах (рис  $1,\delta$ ). В 78 полиморфных сайтах из 160 эвенкийский и ненецкие олени обладают общими аллельными вариантами.

Прочитанных полных митохондриальных геномов R. tarandus на данный момент недостаточно, чтобы выявить большую долю генетической изменчивости, обнаруженную в предыдущих исследованиях с использованием последовательностей цитохрома b, контрольного региона и СОІ (табл. 2). Однако полученные нами данные позволяют судить о том, как распределены полиморфные сайты по митохондриальному геному R. tarandus (рис. 1, $\theta$  и табл. 2). На основании данных по большему числу митохондрионов возможно объединить гаплотипы маркеров, быстро накапливающих замены (D-петля и цитохром b) в гаплогруппы, учитывая информацию по более "медленным" маркерам, в том числе не изученным для *R. tarandus* (таким как вторая и третья субъединицы цитохромоксидазы, NADH-дегидрогеназы и АТФазы). Наблюдаемая изменчивость по NADH-дегидрогеназам и ATФазам (рис. 1,e) может служить материалом для отбора к климатическим условиям или к высоким широтам,



**Рис. 1.** Анализ полиморфизма мтДНК для полных геномов и данных из GenBank по отдельным маркерам. a — филогения четырех особей R. tarandus с известными последовательностями митохондриальных геномов;  $\delta$  — число уникальных аллелей для каждого из полных митохондрионов и число общих аллелей для двух и трех особей; s — доля полиморфных сайтов на маркер для полных митохондрионов (отмечено серым) и для выборок по отдельным маркерам, взятым из GenBank.

как это раньше наблюдалось на материале других млекопитающих [22, 23].

Разработанная система праймеров позволяет упростить задачу секвенирования митохондриальных геномов *R. tarandus* для изучения их попу-

ляционной истории и демографии, а также адаптационных процессов. В дальнейших исследованиях данная система будет оптимизирована для получения более устойчивой амплификации на фрагменте L\_2915—R\_8934 и использована для

**Таблица 2.** Нуклеотидное разнообразие ( $\pi$ ) для некоторых митохондриальных маркеров *R. tarandus* 

	16S rRNA	ND2	COI	COII	ND5	ND6	cytB	<b>D</b> -петля
Полный митохондрион $(n = 4)$	0.00118	0.00575	0.00475	0.00438	0.00394	0.00758	0.00715	0.0141
Отдельные маркеры (по данным из GenBank)	0.00272 $(n = 5)$	_	0.00425 ( $n = 183$ )	_	_	_	0.05906 $(n = 395)$	0.02795 ( $n = 1831$ )

Примечание. Для значений  $\pi$  по данным предшествующих работ указаны последовательности в GenBank по состоянию на декабрь 2019 г.

секвенирования накопленного материала по российским диким и одомашенным популяциям северного оленя.

Данная работа была поддержана грантом РФФИ № 17-29-08003.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Meng X., Aryal A., Tait A. et al.* Population trends, distribution and conservation status of semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus*) in China // J. for Nat. Conservation. 2014. V. 22. № 6. P. 539–546. https://doi.org/10.1016/j.inc.2014.08.008
- 2. Festa-Bianchet M., Ray J.C., Boutin S. et al. Conservation of caribou (Rangifer tarandus) in Canada: An uncertain future // Canadian J. Zool. 2011. V. 89. № 5. P. 419–434. https://doi.org/10.1139/z11-025
- 3. Давыдов А.В., Холодова М.В., Мещерский И.Г. и др. Дифференциация диких и домашних форм северного оленя (Rangifer tarandus L.) по результатам анализа мтДНК // С.-х. биология. 2007. № 6. С. 1083—1093.
- 4. Cronin M.A., MacNeil M.D., Patton J.C. 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) // J. Heredity. 2006. V. 97. № 5. P. 525–530. https://doi.org/10.1093/jhered/esl012
- 5. Холодова М.В., Колпащиков Л.А., Кузнецова М.В., Баранова А.И. Генетическое разнообразие диких северных оленей (Rangifer tarandus) Таймыра: анализ полиморфизма контрольного региона митохондриальной ДНК // Известия РАН, Серия биологическая. 2011. № 1. С. 52—60. https://doi.org/10.7868/S0002332916060023
- 6. *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.
- 7. *Galtier N., Nabholz B., Glémin S., Hurst G.D.D.* Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: A reappraisal // Mol. Ecol. 2009. V. 18. № 22. P. 4541–4550. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x
- 8. Cronin M.A., MacNeil M.D., Patton J.C. Variation in mitochondrial DNA and microsatellite DNA in caribou (Rangifer tarandus) in North America // J. Mammalogy. 2005. V. 86. № 3. P. 495–505. https://doi.org/10.1644/1545-1542(2005)86[495:VI-MDAM]2.0.CO;2
- 9. Kvie K.S., Heggenes J., Røed K.H. Merging and comparing three mitochondrial markers for phylogenetic studies of Eurasian reindeer (Rangifer tarandus) // Ecol.

- and Evol. 2016. V. 6. № 13. P. 4347–4358. https://doi.org/10.1002/ece3.2199
- 10. *Achilli A., Bonfiglio S., Olivieri A. et al.* The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome // PLoS One. 2009. V. 4. № 6. P. e5753. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005753
- 11. *Achilli A., Olivieri A., Pellecchia M. et al.* Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle // Curr. Biol. 2008. V. 18. № 4. P. R157–R158. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.019
- 12. *Ju Y., Liu H., Rong M. et al.* Complete mitochondrial genome sequence of Aoluguya reindeer (*Rangifer tarandus*) // Mitochondrial DNA Part A. 2016. V. 27. № 3. P. 2261–2262. https://doi.org/10.3109/19401736.2014.984171
- 13. *He L., Dai B., Zeng B. et al.* The complete mitochondrial genome of the Sichuan Hill Partridge (*Arborophila rufipectus*) and a phylogenetic analysis with related species // Gene. 2009. V. 435. № 1–2. P. 23–28. https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.01.001
- 14. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat. Methods. 2012. V. 9. № 4. P. 357–359. https://doi.org/10.1038/nmeth.1923
- 15. *Katoh K., Asimenos G., Toh H.* Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT // Bioinf. for DNA Sequence Analysis. Humana Press, 2009. P. 39–64. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9 3
- 16. *Kvie K.S.*, *Heggenes J.*, *Anderson D.G. et al.* Colonizing the High Arctic: Mitochondrial DNA reveals common origin of Eurasian archipelagic reindeer (*Rangifer tarandus*) // PLoS One. 2016. V. 11. № 11. P. e0165237. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165237
- 17. Cronin M.A., MacNeil M.D., Patton J.C. 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) // J. Heredity. 2006. V. 97. № 5. P. 525–530. https://doi.org/10.1093/jhered/esl012
- 18. Wilkerson C.D., Mahoney S.P., Carr S.M. Post-glacial recolonization of insular Newfoundland across the Strait of Belle Isle gave rise to an endemic subspecies of woodland caribou, Rangifer tarandus terranovae (Bangs, 1896): Evidence from mtDNA haplotypes // Genome. 2018. V. 61. № 8. P. 575–585. https://doi.org/10.1139/gen-2017-0199
- 19. *Yannic G., Pellissier L., Ortego J. et al.* Genetic diversity in caribou linked to past and future climate change // Nat. Climate Change. 2014. V. 4. № 2. P. 132–137. https://doi.org/10.1038/nclimate2074
- Eger J.L., Birt T.P., Gunn A., Baker A.J. Genetic diversity and history of Peary caribou (Rangifer tarandus) in North America // Proc. From the Caribou Genet. and Relationships Workshop. Edmonton, Canada. 2009. P. 73–101.
- 21. *Librado P., Rozas J.* DNA SP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359

- 22. Yu L., Wang, X., Ting N., Zhang Y. Mitogenomic analysis of Chinese snub-nosed monkeys: Evidence of positive selection in NADH dehydrogenase genes in highaltitude adaptation // Mitochondrion. 2011. V. 11. № 3. P. 497–503.
  - https://doi.org/10.1186/s12862-017-0896-0
- 23. Slimen H.B., Schaschl H., Knauer F., Suchentrunk F. Selection on the mitochondrial ATP synthase 6 and the NA-DH dehydrogenase 2 genes in hares (*Lepus capensis* L., 1758) from a steep ecological gradient in North Africa // BMC Evol. Biol. 2017. V. 17. № 1. P. 46. https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.01.004

## Primer System for Reindeer (Rangifer tarandus) Mitochondrial Genome Sequencing

I. V. Artyushin<sup>a, b</sup>, E. A. Konorov<sup>a, c, \*</sup>, K. A. Kurbakov<sup>a, c</sup>, and Y. A. Stolpovsky<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>c</sup>Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, 109316 Russia

\*e-mail: casqy@vandex.ru

In our study we developed primer system and optimized PCR protocol for amplification of reindeer (*Rangifer tarandus*) mitochondrial genome. We sequenced and assembled two mitochondrial genomes of wild and domestic reindeer from Nenets Autonomous Okrug. These two genomes were compared with known sequenced mitochondriomes of domestic reindeers from Aoluguya (China) and Horonobe (Japan). Amongfound 160 polymorphic sites some of them has private alleles for domestic and wild reindeer from Nenets Autonomous Okrug. Developed system helps to provide new information for phylogeographic and genetic variation studies of reindeer and to add data from unexamined for reindeer mitochondrial marker such as ND1–ND6 и ATP6, ATP8.

Keywords: Rangifer tarandus, mitochondrial genome, polymorphism.