

Разнообразие европейской популяции сайгака (*Saiga tatarica tatarica*) по нейтральным и функционально значимым маркерам

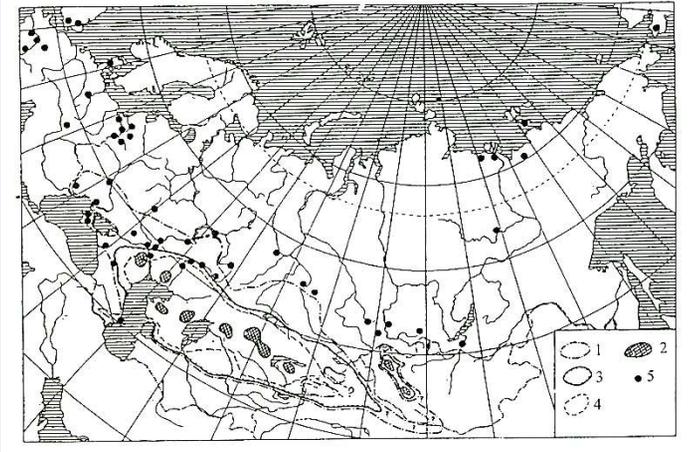


Институт
проблем
экологии и
эволюции им.
А.Н.
Северцова



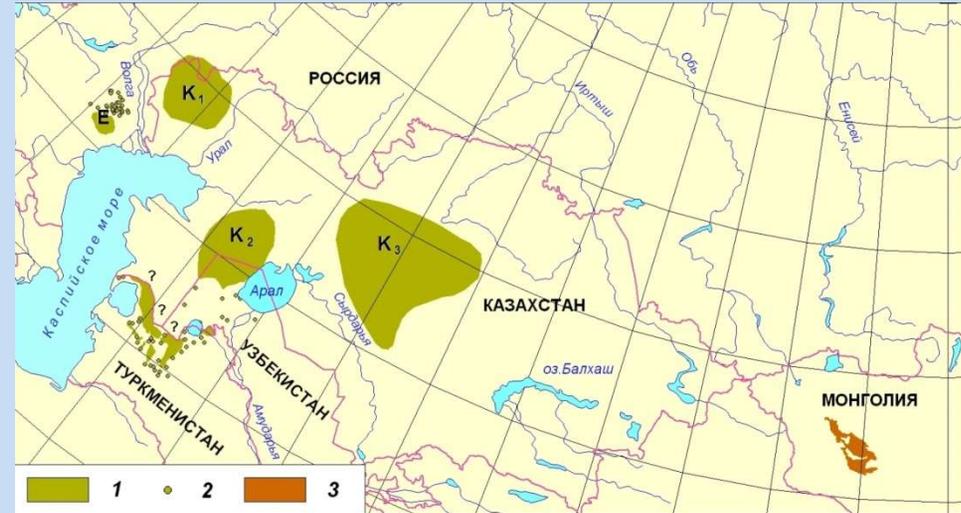
Сорокин П.А., Кашинина Н.В.
Кабинет методов молекулярной
диагностики ИПЭЭ РАН

Динамика ареала *S. tatarica*



- 1 – восстановленный ареал за исторический период,
- 2 – основные очаги обитания в конце 19 – начале 20 вв.,
- 3 – область обитания в 50-60-е годы 20 в.,
- 4 – то же в 1975-1993 гг.,
- 5 – места ископаемых находок (по: Барышников и др., 1998)

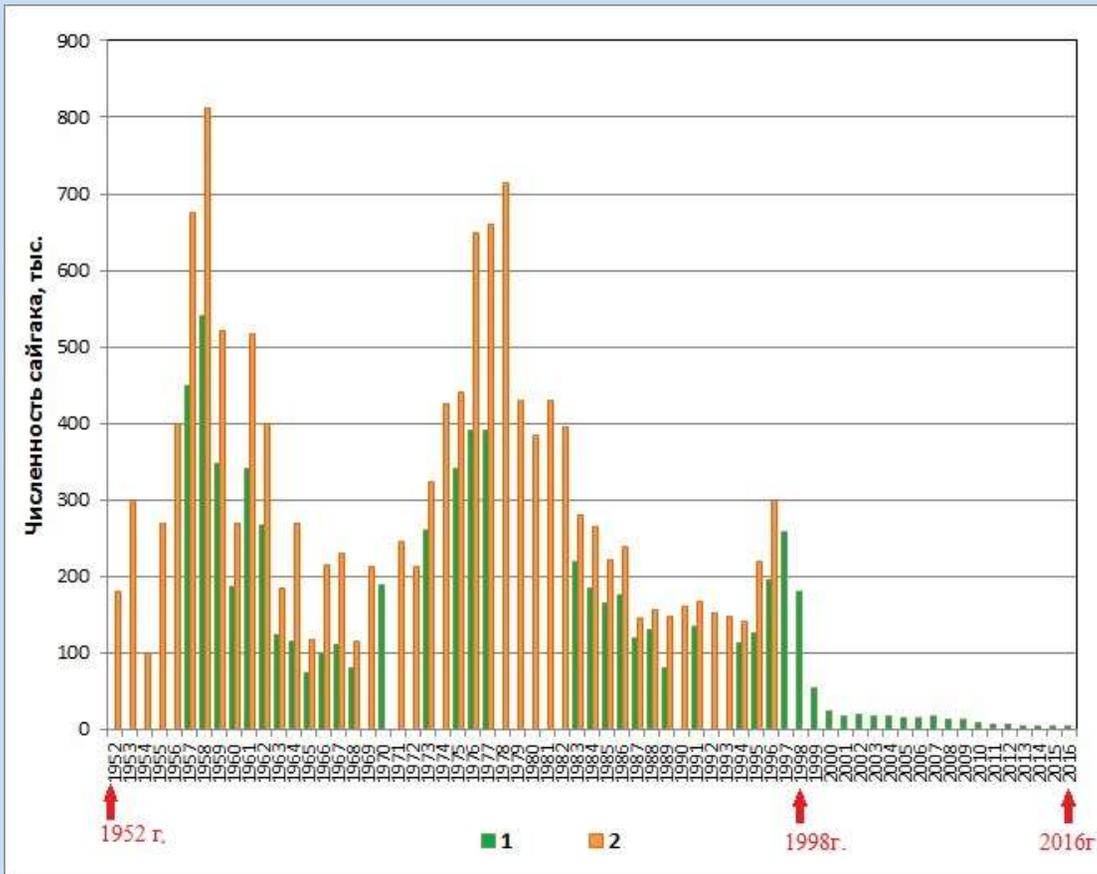
Современный ареал *S. tatarica*



Ареал *S.t.tatarica* (1) (популяции: Е – Северо-Западного Прикаспия; К₁ – уральская; К₂ – устьуртская; К₃ – бетпакдалинская) и места встреч *S.t.tatarica* (2) в последние годы; ареал *S.t.mongolica* (= *S.borealis*) (3) (по: Каримова и др., 2017)



Динамика численности *S. t. tatarica*



Многолетняя динамика численности сайгака в Северо-Западном Прикаспии: 1 – в мае, 2 – в августе (по: Каримова и др., 2017)



Conservation status

Family: Bovidae

Subfamily: Antilopinae

Genus: *Saiga*



Critically Endangered
(IUCN 3.1)

С 1998 г. по 2012 г.

численность сократилась со 150000 до 7500 особей (Неронов и др., 2011; 2013)

В 2016 г. – согласно экспертной оценке составила около **3500** особей

В 2019 г - около **5000** особей (Добрынин, Сухова, 2020)

Резкое снижение численности



Утрата генетического разнообразия

Для его сохранения необходима пороговая величина численности, составляющая 500 – 5000 особей (Soule, 1987; Frankham et al., 2014.) для крупных млекопитающих.



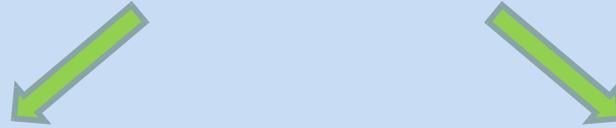
Снижение общей жизнеспособности

- ухудшение сопротивлению заболеваниям
- ухудшение репродуктивных возможностей
- повышение смертности молодняка

(Soule, 1987; Luikart et al., 1998; Frankham, 2005; Willi et al., 2006)



Комплексный анализ изменчивости маркеров



Селективно нейтральные маркеры

связаны с динамикой численности
животных

- **Митохондриальная ДНК** (передается только по материнским линиям наследования)
- **Микросателлитные локусы ядерной ДНК** (передаются и по отцовской, и по материнской линиям наследования), используются для относительно коротких временных срезов «ecological time scales» (Schlötterer, 2000; Storfer et al. 2010; Тетушкин, 2013)

Функционально значимые маркеры

обуславливают адаптивные
возможности видов

- **Гены Главного Комплекса Гистосовместимости (ГКГ)** играют огромную роль в формировании иммунного ответа у позвоночных (Benacerraf Varuj, 1981), особенно важны для видов, численность которых длительное время катастрофически снижается (Sommer, 2005)



Цель работы

Описать современное генетическое разнообразие популяции сайгака (*S. t. tatarica*) Северо-Западного Прикаспия в период последней депрессии численности, с использованием селективно нейтральных и функционально значимых маркеров – контрольного региона мтДНК, микросателлитных локусов ядерной ДНК и гена *DRB3* II класса ГКГ.



Задачи

1. Охарактеризовать уровень разнообразия популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия на основании полиморфизма следующих молекулярных маркеров:

- контрольного региона мтДНК (D-петли)
- микросателлитных локусов ядерной ДНК
- функционально значимого гена DRB3 II класса Главного Комплекса Гистосовместимости (ГКГ)

2. Провести сравнительный анализ характера изменения показателей генетического разнообразия за последние два десятилетия продолжающейся депрессии численности по мтДНК и микросателлитным локусам.

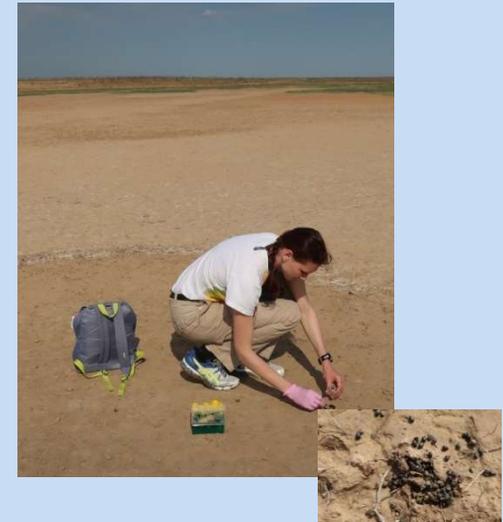
3. Провести сравнительный анализ значений показателей генетического разнообразия популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия с аналогичными данными, полученными для других популяций сайгака.



Материалы и методы

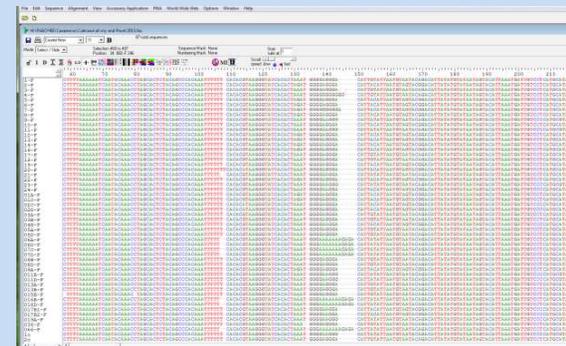
Выборка образцов

Образцы были собраны на территориях заповедника «Черные Земли» и заказника «Степной» (n=95)
- 1999-2000 гг. – «Old» group – мышечные ткани, шерсть
- 2010-2011, 2016гг. – «New» group – пуповина, экскременты, мышечные ткани (волкобой)



Молекулярные маркеры

-контрольный регион мтДНК
-8 микросателлитных локусов (STa14, STa20, STa26, STa30, STa39, STa41, STa43 и STa47 (Nowak at al., 2013)
- фрагмент функционально-значимого гена *DRB3* II класса ГКГ



BioEdit



Mega5.2



Network5.0



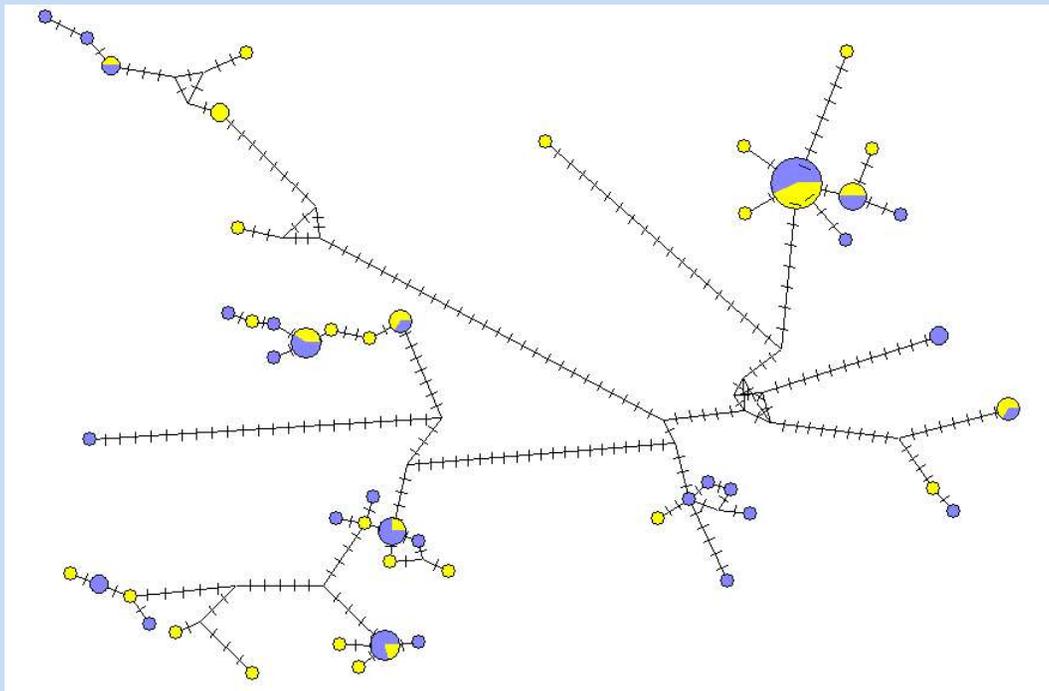
WinArl35



Structure2.3.4

GenAlEx6.5

Результаты анализа контрольного региона мтДНК



Медианная сеть гаплотипов контрольного региона мтДНК сайгака популяции Северо-Западного Прикаспия (920 п.н.)

$n=86$ (old=45, new=41)

Описан 51 гаплотип

Гаплотипическое

(генное) разнообразие (H)

– 0.924

Нуклеотидное

разнообразие (π) – 0.028



Высокий уровень генетического разнообразия по контрольному региону мтДНК

Выборка	$H \pm S.E.$	$\pi \pm S.E.$
«Old» group	0.916 \pm 0.027	0.027 \pm 0.012
«New» group	0.940 \pm 0.025	0.028 \pm 0.014
«Old» and «New» group	0.924 \pm 0.018	0.028 \pm 0.014

Показатели генетического разнообразия для выборок образцов сайгака Северо-Западного Прикаспия, собранных в разные периоды депрессии численности

Высокий уровень генетического разнообразия по контрольному региону мтДНК Почему?

мтДНК наследуется по материнским
линиям



Сходный уровень генетического разнообразия контрольного региона мтДНК двух одновременных выборок говорит о том, что **промежуток времени в 10-20 лет**, когда наблюдалась критически низкая численность сайгака, **может быть слишком короток для утраты разнообразия материнских линий.**

численности сайгака - **снижение доли половозрелых самцов**

У сайгака – высокая скорость размножения (за счет раннего полового созревания самок и их высокой плодовитости)

Разнообразие мтДНК предковой популяции сайгака было еще выше



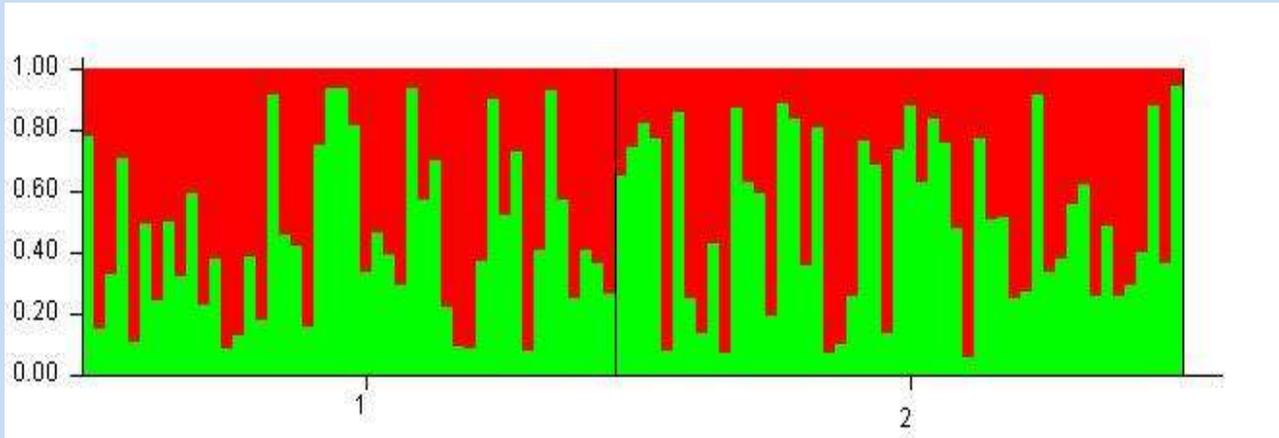
«бутылочные горлышки»



утрата генетического разнообразия

Подтверждается результатами исследования П. Кампос древней ДНК сайгака (Campos et al., 2010). В нем было показано, что гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие по короткому фрагменту контрольного региона мтДНК (280 п.н.) у сайгаков Плейстоцена было значительно выше, чем у современных.

Результаты анализа микросателлитных локусов ядерной ДНК

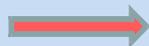


n=95 (old=46, new=49)

Кластеризация образцов сайгака Северо-Западного Прикаспия в программе STRUCTURE 2.3.4. (K=2)
1 - «Old», 2 - «New»



Низкие показатели
гетерозиготности



Описан 41 аллель (для объединенной выборки)
Среднее число аллелей на локус (N_a) – 5.125
Эффективных аллелей (N_e) – 2.625

Ожидаемая гетерозиготность (H_e) составила – 0.422
Наблюдаемая гетерозиготность (H_o) – 0.514

Наибольшее отклонение от Харди-Вайнберга было отмечено для трех локусов – STa26, STa30 и STa43 ($P < 0.001$)

Коэффициент информативности (I) – 0.997

Повышенный
коэффициент
инбридинга



Коэффициент инбридинга (F_{is}) – 0.181

Низкий уровень генетического разнообразия по микросателлитным локусам

Возможные причины

Снижение доли половозрелых самцов

Снижение эффективной численности (N_e)

В начале 90-х общая численность ~150 тыс.

В начале 2000-х N_e ~ **500-1500**, при общей численности 12-15 тыс.

В 2019 г $N_e=1850$, при общей численности около 5 тыс.



$$N_e = 4N_m N_f / (N_m + N_f)$$

N_m – количество самцов

N_f – количество самок

(Wright, 1938)

Сравнение показателей генетического разнообразия для каждого микросателлитного локуса образцов сайгака Северо-Западного Прикаспия (жирным шрифтом) с образцами сайгаков из двух (Бетпакдалинская и Уральская) популяций Казахстана (Nowak et al., 2013)

	STa14	STa20	STa26	STa41	STa30	STa39	STa43	STa47	Средние значения для сайгака СЗП+/- S.E.
N (СЗП/Б/У)	95/25/25	95/25/25	94/25/25	95/25/25	95/25/25	95/25/25	95/25/25	95/25/25	
Na	2	4	6	9	2	7	8	3	5.125+/-0.972
Ne	1,957	1,210	2,411	5,148	1,471	3,379	4,025	1,401	2.625+/-0.504
Ho (СЗП/Б/У)	0.411/0.60/0.52	0.189/0.28/0.36	0.489/0.64/0.56	0.758/0.92/0.74	0.126/0.20/0.04	0.674/0.84/0.80	0.484/0.80/0.75	0.242/0.48/0.56	0.514+/-0.083
He (СЗП/Б/У)	0.489/0.53/0.53	0.173/0.32/0.37	0.585/0.55/0.49	0.806/0.85/0.73	0.320/0.25/0.04	0.704/0.79/0.69	0.752/0.88/0.70	0.286/0.47/0.61	0.422+/-0.080
I	0.682	0.354	1.026	1.792	0.500	1.430	1.633	0.556	0.997+/-0.197
F	0.161	-0.093	0.164	0.059	0.605	0.043	0.356	0.154	0.181+/-0.076
HWE	ns	ns	***	ns	***	ns	***	*	

N – количество образцов; Na – количество аллелей; Ne – количество эффективных аллелей; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность; I – коэффициент информативности Шеннона; F – индекс фиксации; HWE – значения вероятности, полученные с помощью теста Харди-Вайнберга (ns = not significant; * P<0.05; *** P<0.001)

СЗП – популяция сайгака Северо-Западного Прикаспия; Б and У – сайгаки Казахстана (Бетпакдалинская и Уральская популяции, соответственно) (Nowak et al., 2013).

Для сайгаков из популяций Казахстана приведены показатели: N, Ho и He. Остальные показатели представлены только для популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия.

Низкий уровень генетического разнообразия по микросателлитным локусам

Возможные причины

Снижение доли половозрелых самцов

Снижение эффективной численности (N_e)

В начале 90-х общая численность ~150 тыс.

В начале 2000-х N_e ~ **500-1500**, при общей численности 12-15 тыс.

В 2019 г $N_e=1850$, при общей численности около 5 тыс.

Возможно, утрата генетического разнообразия по микросателлитам произошла в недалеком прошлом, и на этот процесс повлияла утрата отцовских линий, которая на данный момент не обнаружена.

НО:

Учитывая историю колебания численности вида, нельзя не принимать во внимание тот факт, что эта утрата могла произойти как в период последней депрессии численности, так и ранее.

$$N_e = 4N_m N_f / (N_m + N_f)$$

N_m – количество самцов

N_f – количество самок

(Wright, 1938)



Выводы

1. В популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия установлен высокий уровень генетического разнообразия контрольного региона мтДНК, который можно объяснить двумя причинами: первая причина – 10-20 лет – недостаточное количество времени для его снижения, вторая – исходно еще более высокое разнообразие предковой популяции.

2. При сравнительном анализе образцов сайгака за последние два десятилетия продолжающейся депрессии численности по контрольному региону мтДНК и микросателлитным локусам ядерной ДНК значимых различий в показателях выявлено не было.

3. Низкий уровень изменчивости микросателлитных локусов ядерной ДНК, полученный для сайгака исследуемой популяции, может являться следствием браконьерской охоты на взрослых самцов, нарушением половозрастной структуры и утратой отцовских линий.

4. При сравнительном анализе данных, полученных для сайгака европейской популяции по микросателлитным локусам ядерной ДНК, с аналогичными данными, полученными для сайгаков из Казахстана (Бетпакдалинская и Уральская популяции) было установлено, что уровень гетерозиготности в выборке образцов сайгаков Северо-Западного Прикаспия был несколько ниже в шести из восьми локусов, чем в выборке сайгаков из казахстанских популяций. Это может быть связано с более высоким исходным уровнем численности популяций сайгака Казахстана.



Цель работы – описать аллельное разнообразие гена DRB3 Главного Комплекса Гистосовместимости (класс II) у сайгака (*Saiga tatarica*) методом полногеномного секвенирования NGS и сравнить его с полиморфизмом этого гена у других представителей семейства Bovidae.



Гены ГКГ кодируют поверхностные белки клеток, играющие определяющую роль в инициации иммунного ответа.

Состоит из трех классов генов:

1. Продукты генов ГКГ класса I экспрессируют большинство клеток организма (кроме эритроцитов и плаценты). Молекулы класса I представляют пептиды, производные от внутриклеточных белков. Мишенями для белков генов класса I ГКГ являются антигены внутриклеточного происхождения, а также опухолевые маркеры. Участвуют в первую очередь в защите от вирусных, а также от внутриклеточных бактериальных инфекционных заболеваний.

2. Продукты генов ГКГ класса II – постоянно экспрессируются только в профессиональных антигенпредставляющих клетках (дендритные клетки, макрофаги, лимфоциты). Молекулы класса II представляют пептиды, производные от внеклеточных белков. Мишенями для белков генов класса II ГКГ являются антигены внеклеточного происхождения.

3. Третий класс генов не связан с иммунитетом.

Материалы и методы

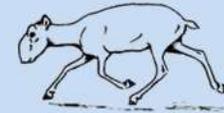
Для работы мы использовали образцы пуповины от 12 новорожденных сайгаков, собранные на территории заповедника “Черные Земли” в Калмыкии в 2011 году.





Эмульсионная ПЦР с использованием набора с эмульсионным маслом и реагентов для эмПЦР лигированных библиотек.
ПЦР продукт секвенировали с использованием реакции параллельного пирофосфатного секвенирования (технология 454) на частицах-носителях на аппарате GS Junior (Roche, США) на базе ЦКП “Геном” ИМБ РАН.

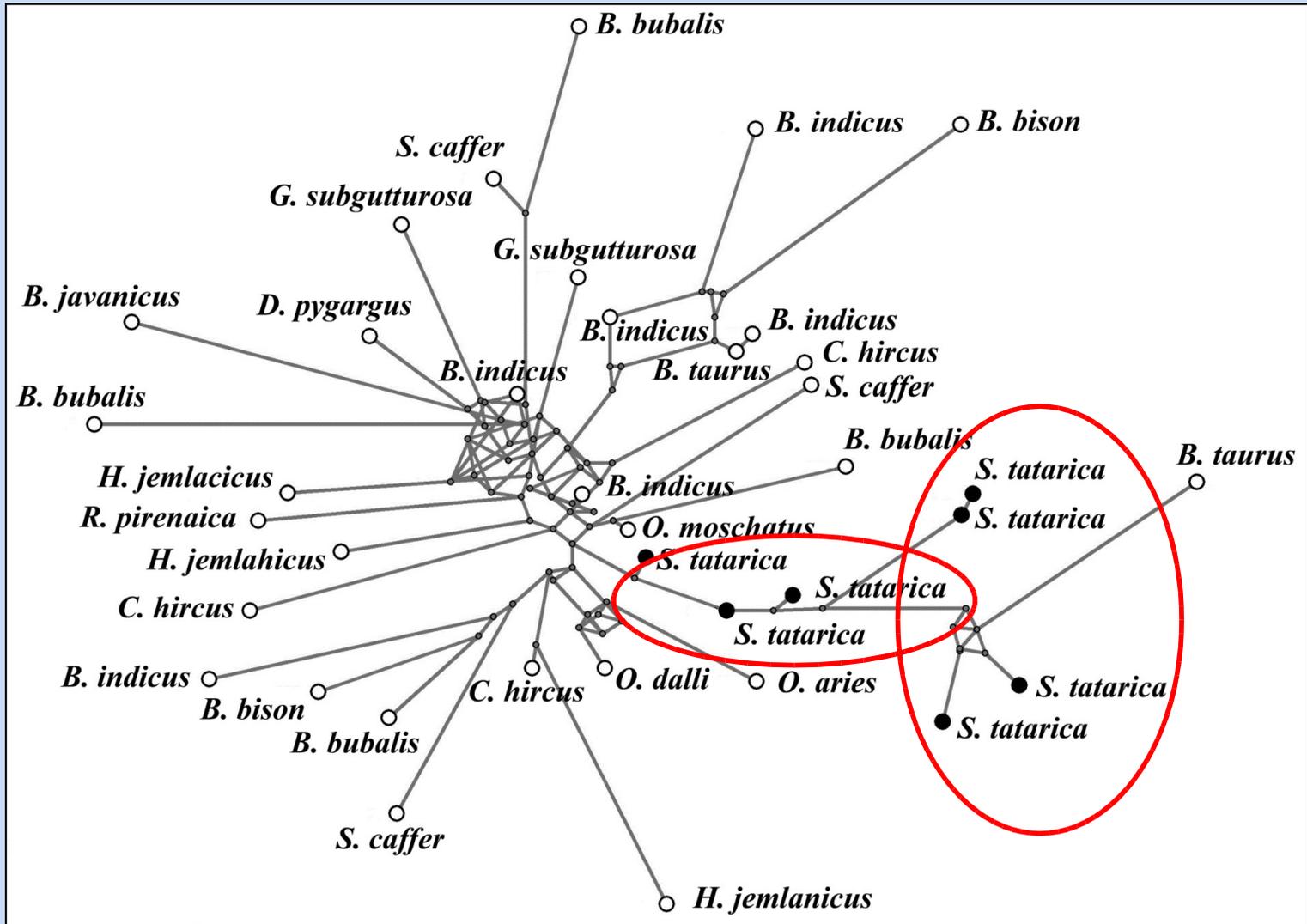
Результаты

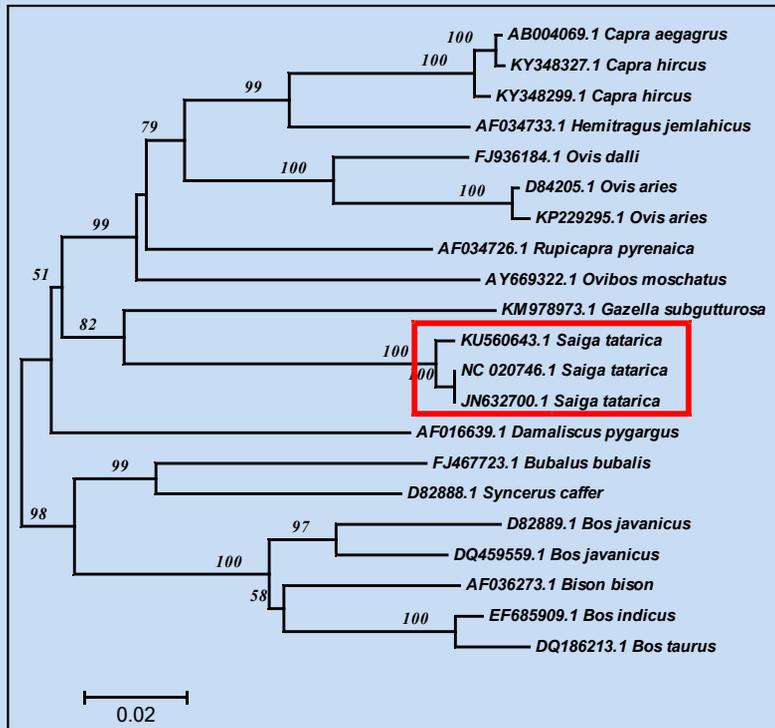


Для изученной выборки сайгаков описано семь аллелей гена DRB3. Нуклеотидные последовательности аллелей (250 п.н.) помещены в международную генетическую базу NCBI под номерами MF960850 - MF960856.

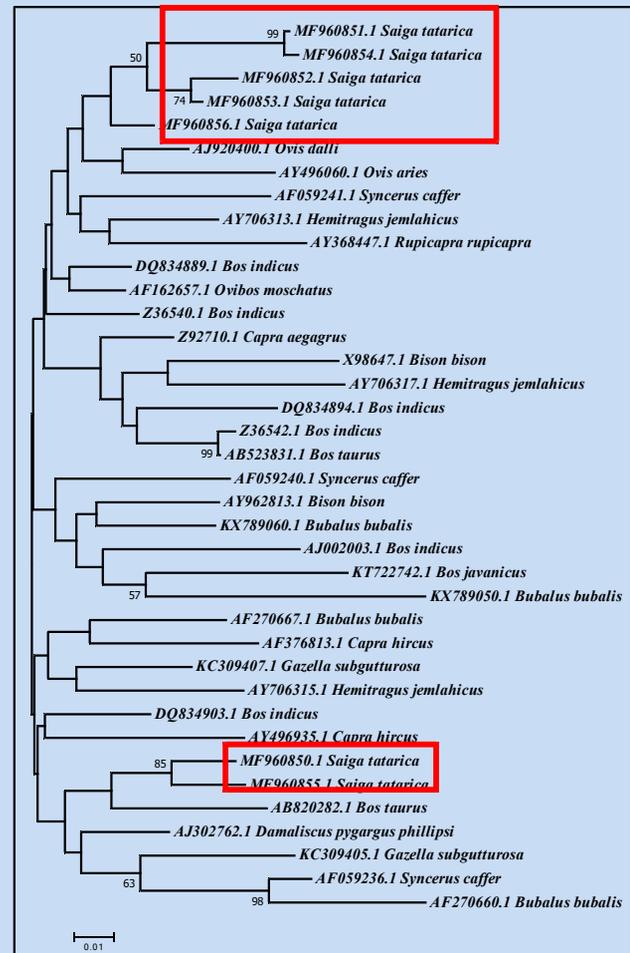
Все животные были гетерозиготны по аллелям гена DRB3.

Сравнение аллелей гена *DRB3* сайгака с другими полорогими





Филогенетическое дерево гаплотипов цитохрома *b* мтДНК, построенное методом Neighbor joining с эволюционной моделью Тамура-Нея.



Филогенетическое дерево аллелей гена *DRB3*, построенное методом Neighbor joining с эволюционной моделью Тамура-Нея.

Филогенетические связи аллелей гена *DRB3* сайгака и других полорогих не соответствуют систематическому положению сайгака в семействе Bovidae.

Выводы

1. Впервые описаны нуклеотидные последовательности аллелей гена DRB3 (ГКГ класс II) сайгака.
2. У животных обнаружена высокая степень гетерозиготности.
3. Предполагается, что полиморфизм аллелей гена DRB3 ГКГ сайгака в первую очередь обусловлен множеством возбудителей заболеваний, воздействующих на популяцию сайгаков в ходе эволюционной истории.



Публикации

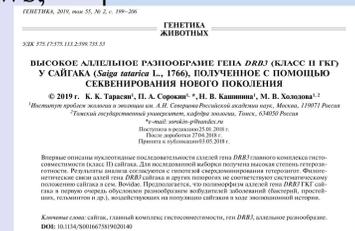


Статьи

- **Холодова М.В., Кашинина Н.В., Луцкекина А.А., Сорокин П.А.** Генетическое разнообразие популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия во время последней депрессии численности: предварительные результаты // *Saiga News*, 2018. Вып.23. – С. 29-31.
- **Тарасян К.К., Сорокин П.А., Кашинина Н.В., Холодова М.В.** Высокое аллельное разнообразие гена DRB3 (класс II ГКГ) у сайгака (*Saiga tatarica* L., 1766), полученное с помощью секвенирования нового поколения // *Генетика*, 2019. № 2(55). – С. 199-206.
- **Кашинина Н. В., Холодова М. В., Сорокин П. А., Тарасян К. К., Луцкекина А. А.** О генетическом потенциале устойчивости популяции сайгаков Северо-Западного Прикаспия к воздействию гельминтов и других внеклеточных паразитов // *Saiga News*, 2021. Вып.26. – С. 31-32.

Материалы работы опубликованы в виде тезисов и доложены на трех конференциях

- **Кашинина Н.В., Сорокин П.А., Луцкекина А.А., Холодова М.В.** Генетическое разнообразие популяции сайгака Северо-Западного Прикаспия в период последней депрессии численности по данным полиморфизма контрольного региона мтДНК // Материалы III Международной научной конференции «Биологическое разнообразие и проблемы охраны фауны». Ереван. 27-29 сентября. 2017.
- **Кашинина Н.В., Холодова М.В., Сорокин П.А., Луцкекина А.А.** Современное генетическое разнообразие сайгака (*Saiga tatarica* L., 1766) Северо-Западного Прикаспия на основании полиморфизма контрольного региона мтДНК и микросателлитных локусов // Материалы II Международной конференции молодых ученых по вопросам биоразнообразия и сохранения дикой природы. Цахкадзор. 5-7 октября. 2018. – С.85-87.
- **Kashinina N., Kholodova M., Sorokin P., Lushchekina A.** The genetic diversity of saiga (*Saiga tatarica tatarica*) population from the North-West Pre-Caspian region: mtDNA control region and microsatellite analyses // Materials of the conference Wildlife Research and Conservation 2019. Berlin. 30th September to 2nd October 2019. – P. 173



Благодарности

- д.б.н. Холодовой М.В. за научное руководство
- Сотрудникам заповедника «Черные Земли» и заказника «Степной» за помощь в сборе полевого материала
- к.б.н. Лушекиной А.А. за консультации и постоянную поддержку
- Сотрудникам ИПЭЭ РАН: Пояркову А.Д., Эрнандес-Бланко Х.А., Александрову Д.Ю.
- Сотрудникам лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ «ВНИРО» за возможность проведения опытов и поддержку
- Гранту РФФИ №17-04-01351 и программе Президиума РАН № I.21П «Биоразнообразие природных систем. Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы», оказавшим финансовую поддержку данным исследованиям
- Были использованы фотографии Сорокина П.А., Кашиной Н.В.



Спасибо за внимание!

