

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет

Кафедра генетики та молекулярної біології

ДИПЛОМНА РОБОТА

бакалавра

на тему «**Диференціація китоподібних за молекулярними маркерами**»

«Differentiation of cetaceans by molecular markers»

Виконав: студент денної форми навчання
напряму підготовки 6.040102 Біологія
Куку Назім Мамутович

Керівник: д.б.н., с. н. с.,
член-кореспондент НААН
Чеботар Сабіна Віталіївна

Рецензент: к.б.н., доцент
Радіонов Денис Борисович

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

№ _____ від «___» _____ р.

Завідувач кафедри

_____ Чеботар С. В.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Захищено на засіданні ЕК № _____

Протокол № _____ від «___» _____ р.

Оцінка _____ / _____ / _____

(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Голова ЕК

_____ Стойловський В. П.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Одеса – 2017

АНОТАЦІЯ

Досліджували ступінь генетичного поліморфізму серед дельфінів Азово-Чорноморського басейна.

Для досліджень використовували метод виділення ДНК із зразків трупної крові і фрагментів м'язової тканини дельфінів, ПЛР з використанням мікросателітних маркерів, електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ).

Встановлені алельні характеристики за локусами D-18, D-22 і EV37Mn у генотипах дельфінів.

Роботу викладено на 40 сторінках, вона містить 2 таблиці та 2 рисунки. Наведено посилання на 46 джерел літератури (25 публікацій кирилицею та 21 латиницею)

Ключові слова: *Tursiops truncatus*, Cetacea, генетичний поліморфізм, ДНК, мікросателітний аналіз, ПЛР-аналіз.

The degree of genetic polymorphism among the Black Sea dolphins was studied.

The method of DNA allocation from muscle fragments or blood traces was used for research, PCR with using microsatellite markers and electrophoresis in polyacrylamide gel (PAGE) were used as well.

Allelic characteristics of loci D-18, D-22 і EV37Mn were established in genotypes of dolphins.

Diploma thesis is expounded on 40 pages, it contains 2 tables and 2 figures. It provides links to 46 references (25 cyrillic and 21 latinic).

Keywords: *Tursiops truncatus*, Cetacea, genetic polymorphism, microsatellite analysis, DNA, PCR-analysis.

ПРИЙНЯТІ СКОРОЧЕННЯ ТА АБРЕВІАТУРИ

п.н. – пар нуклеотидів

ПДРФ – поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

НАНУ – Національна академія наук України

dATP – дезоксиаденозинтрифосфат

dCTP – дезоксицитидинтрифосфат

dGTP – дезоксигуанідинтрифосфат

dTTP – дезокситимідинтрифосфат

TBE – трис-борат-ЕДТА буфер

TEMED – N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін

ЗМІСТ

ВСТУП	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Систематичне положення <i>Delphinus delphis</i>	6
1.2. Морфологія та фізіологія ряду китоподібні (Cetacea)	6
1.3. Біологія дельфінів Азово-Чорноморського басейну	9
1.3.1. Дельфін-білобочка - <i>Delphinus delphis</i>	9
1.3.2. Афаліна чорноморська - <i>Tursiops truncatus</i>	10
1.3.3. Азовка, або фоцена звичайна - <i>Phocoena phocoena</i>	11
1.4. Молекулярно-генетичні методи для диференціації дельфінів.....	11
1.4.1. Мітохондріальний аналіз	14
1.4.2. Мікросателітний аналіз.....	15
1.5. Визначення популяції китоподібних.....	16
1.6. Визначення виду китоподібних.....	18
1.7. Соціальна організація китоподібних.....	19
1.8. Визначення батьківства китоподібних	21
1.9. Виявлення гібридів китоподібних	22
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	23
2.1. Матеріали дослідження.....	23
2.2. Виділення ДНК з тканин і клітин дельфінів.....	23
2.3. Проведення ампліфікації за допомогою ПЛР.....	24
2.4. Електрофорез продуктів ампліфікації в ПААГ	25
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	26
УЗАГАЛЬНЕННЯ	34
ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	36

ВСТУП

В останні роки у світі спостерігається інтенсивний розвиток робіт, пов'язаних з вивченням дельфінів. Це пояснюється необхідністю більш глибокого дослідження промислових видів, у зв'язку з різким погіршенням стану промислових запасів цих видів; і увагою, що проявляється до китоподібних з метою вивчення їх систем органів, почуттів і шкіряних покривів, для моделювання в техніці; і підвищеним інтересом до зубатих китів, особливо до деяких видів дельфінів, в зв'язку з надзвичайно високим розвитком центральної нервової системи; і все більш широким використанням китоподібних, як експериментальних і циркових тварин. Усі ці дослідження, безсумнівно, стимулювали і широкий спектр морфологічних, екологічних, таксономічних досліджень китів і зокрема дельфінів.

Дельфіни живуть по всій земній кулі, крім, хіба що, найхолодніших областей Арктики і Антарктики. Найпоширеніший вид – афаліна чорноморська (*Tursiops truncatus*) – мешкає в помірних і екваторіальних широтах. Загальна чисельність популяції невідома. Є відомості тільки про чисельність окремих популяцій: мексиканська затока - не менше 67 000 особин; північно-західна частина Тихого океану, включаючи води Японії - близько 35 000 особин; у північноатлантичного узбережжя США - близько 11 700 особин; Середземне море - не менше 10 000 особин; в Чорному морі - близько 7 000 особин.

У Світовому океані є не менше 4 підвидів афалін, незначно розрізняються зовні і рисами черепа, серед них: Чорноморська афаліна (*T. ponticus*, Varabash-Nikiforov, 1940) мешкає в Чорному морі, звичайна афаліна (*T. truncatus*, Montagu, 1821) мешкає в Атлантичному океані і Середземному морі, далекосхідна афаліна (*T. gilli*, Dall, 1873) мешкає в помірно кліматичній північній частині Тихого океану, індійська афаліна (*T. taduncus*), яку деякі зоологи виділяють в самостійний вид (*Tursiops aduncus*). У неї довший дзьоб і

збільшене число верхніх зубів (28 пар замість звичайних 19-24). Мешкає в Червоному морі, в Індійському і Тихому океанах. [4, 43].

У неволі в Україні найчастіше зустрічається Чорноморська афаліна і Далекосхідна афаліна.

В даний час молекулярно-генетичні методи широко застосовуються для вивчення внутрішньовидової структури різних груп тварин, зокрема для генетичної диференціації дельфінів із залученням мікросателітної і мітохондріальної ДНК.

Мета роботи – дослідити ступінь генетичного поліморфізму серед дельфінів Азово-Чорноморського басейна.

Завданнями даної роботи було:

1. Провести огляд літератури, що дозволяє вибрати молекулярні маркери, які можуть бути використані для дослідження дельфінів, їх генетичної диференціації із залученням молекулярних маркерів - для мікросателітної ДНК.
2. Підібрати метод виділення ДНК з тканин і клітин дельфінів.
3. Підібрати метод використання мікросателітного аналізу для визначення генетичного поліморфізму у дельфінів та їх диференціація.

Об'єкт дослідження – генетичний поліморфізм серед дельфінів.

Предмет дослідження – мікросателітні локуси геному дельфінів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Мікросателіти ефективно ампліфікуються з використанням методів ПЛР через їх порівняно невеликих розмірів, які варіюють між особинами. В роботі ми використовували мікросателітний аналіз ДНК дельфінів виділеної із зразків тканин (кров, м'язи) та епітеліальних клітин, які були взяті в дельфінарії «Немо» (м. Одеса).

Було встановлено, що оптимальний матеріал для виділення ДНК дельфінів представляє з собою проби крові і фрагменти м'язової тканини дельфінів.

Нами була виділена ДНК із зразків трупної крові і м'язової тканини дельфінів та проведений мікросателітний аналіз, згідно з яким дельфіни відрізнялися за мікросателітними локусами.

У досліді зразки А1 та А2 співпадають за двома мікросателітними локусами D-18.

Стосовно локуса D-22 ми не можемо говорити о співпадінні, зразки А1 та А3 не ампліфікувалися в ході ПЛР-аналізу.

Локус EV37Mn показав, що зразки А1 та А2 співпадають.

За результатами виконаної роботи зразки із трупної крові і м'якої тканини є більш зручними для виділення ДНК та проведення ДНК-ідентифікації дельфінів, ніж взяття зразків з епітеліальних клітин та слини.

Також можливо те, що нами не була відпрацьована техніка забору проби букального епітелію і, в зв'язку з цим, необхідно повторити спробу взяття зразків і провести аналіз у декількох повторностях, при цьому під час нанесення ДНК на електрофорез брати більшу кількість продуктів ампліфікації.

Для більш ефективного отримання ампліконів слід спробувати застосування методу висушеної плями крові без виділення ДНК, як це широко використовується у медично-судовій експертизі.

ВИСНОВКИ

1. Було проведено огляд літератури, що дозволив вибрати молекулярні маркери для мікросателітної ДНК, які можуть бути використані для дослідження дельфінів та їх генетичної диференціації.
2. Праймери до мікросателітних локусів в геномі дельфінів D-18, D-22 і EV37Mn є оптимальними для генетичної диференціації.
3. За результатами електрофоретичного аналізу найбільш оптимальним є виділення ДНК із крові і фрагментів м'язової тканини дельфінів за допомогою методу із застосуванням Chelex R 100.
4. За допомогою мікросателітного аналізу встановлені алельні характеристики за локусами D-18, D-22 і EV37Mn у генотипах дельфінів.
5. Генотипи дельфінів A1, A2 за мікросателітним локусом D-18 є гомозиготними. Маємо фрагменти ампліфікації довжиною по 80 п.н., для дельфіна A3 характерні два фрагмента ампліфікації розміром 76 п.н. та 84 п.н., тому можна стверджувати, що даний генотип є гетерозиготним.
6. Генотип дельфіна A2 за мікросателітним локусом D-22 є гетерозиготним. Характеризується двома фрагментами ампліфікації довжиною 120 п.н. та 78 п.н.
7. Генотипи дельфінів A1, A2 за мікросателітним локусом EV37Mn є гетерозиготними. Характеризуються спектрами ампліфікації з двох фрагментів, які мають молекулярну вагу 188 п.н. та 192 п.н. Генотип дельфіна A3 за мікросателітним локусом EV37Mn має один фрагмент ампліфікації розміром 188 п.н., що вказує на гомозиготність цього дельфіна за даним локусом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Банникова А.А., Матвеев В.А., Крамеров Д.А. Опыт использования интер-SINE ПЦР в изучении филогенеза млекопитающих // Генетика. –2002. –Т. 38. №6. – С. 853-864.
2. Беридзе Т.Г. Сателлитная ДНК. – М.: Наука, 1982. – 120 с.
3. Биркун А.А. мл., Кривохижин С.В. Звери Черного моря. – Симферополь: Таврия, 1996с. – 95 с.
4. Биркун А.А. мл., Кривохижин С.В. Современное состояние и причины угнетения популяций черноморских дельфинов. Сообщение 2. Антропогенные лимитирующие факторы // Вестн. зоологии. – 1996б. –Т. 30, № 4-5. –С. 53-59.
5. Вейнгер Г.М. Кашалот *Physeter Macrocephalus* // Изменчивость окраски китообразных. –М.: Наука, 1983. – С. 46-69
6. Гептнер В.Г., Чапский К.К., Арсеньев В.А., Соколов В.Е. Ластоногие и зубатые киты. – Москва: Высшая школа, 1976. – Т. 2, № 3 – 718 с.
7. Гольдин П.Е. Регистрирующие структуры *bullatumpani* морской свиньи *Phocoena phocoena relicta* Abel, 1905 (Cetacea, Phocoenidae) // Ученые записки ТНУ. Сер. Биология. – 2001. – Т. 14, № 53 (2). – С. 36-40.
8. Гольдин П.Е., Гольдин Е.Б. Новые подходы в мониторинге состояния популяций морских млекопитающих Азово-Черноморского бассейна // Вопросы развития Крыма. Научно-практический дискуссионно-аналитический сборник. – Вып. 15. Проблемы инвентаризации крымской биоты. – Симферополь: Таврия-плюс, 2003. – С. 20-27.
9. Гречко В.В. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики // Генетика. – 2002. – Т. 38, №8. – С. 1013-1033.
10. Колчинская А.З. Дыхание и кислородные режимы организма дельфинов. – Киев, Наукова думка, 1980. –332с.
11. Константинов А.Я. Эхолокация в природе. – Л.: Наука, 1974 – 103 с.

12. *Клейненберг С.Е.* Млекопитающие Черного и Азовского морей. Опыт биолого-промыслового исследования. – М.: Изд-во АН СССР, 1956. – 288 с.
13. *Клейненберг С.Е., Яблоков А.В., Белькович В.М., Тарасевич М. Н.* Белуха. Опыт монографического исследования вида. – М.: Детская литература, 1964. – 456 с.
14. *Клейненберг С.Е., Белькович В.М., Яблоков А.В.* О выработке единой методики изучения морских млекопитающих // *Морские млекопитающие.* – М.: Наука, 1965. – С. 242-249.
15. *Медников Б.М., Банникова А.А., Ломов А.А., Мельникова М.Н, Шубина Е.А.,* 1995. Рестриктазный анализ повторяющейся ядерной ДНК, критерий вида и механизм видообразования // *Мол.биол.* Т. 29, №6. – С. 1308-1319.
16. *Медников Б.М.* Дивергенция землероек (*Insectivora, Soricidae*) по данным рестриктазного анализа повторяющихся последовательностей ДНК // *Зоол. Журн,* 1996. – Т. 75, Вып. 2. – С. 256-270.
17. *Михалёв Ю.А.* Особенно распределения афалины *Tursiops truncatus* (Cetacea), в Чёрном море // *Вестн. зоологии.* – 2005. – 39, № 3. – С. 29-42.
18. *Михалёв Ю.А.* Особенно распределения афалины *Phocoena phocoena* (Cetacea), в Чёрном море // *Вестн. зоологии.* – 2005. – 39, № 6. – С. 25-35.
19. *Михалёв Ю.А.* Особенно распределения белобочки *Delphinus delphis* (Cetacea), в Чёрном море // *Вестн. зоологии.* – 2005. – 42, №4. – С. 325-337.
20. *Соколова В.Е.* Морфология и экология морских млекопитающих (дельфины). – М. : Наука, 1971.–176с.
21. *Томилин А.Г.* Китообразные // *Звери СССР и прилежащих стран.- Изд-во АН СССР,* 1957. – Т. 9. –С. 756-757.
22. *Томилин А. Г.* Определитель китообразных по поведению и внешним признакам.- Издание МОИП, 1951. –88с.

23. Цалкин В.И. Некоторые наблюдения над биологией дельфинов Азовского и Черного морей // Бюлл. Моск. об-ва исп. природы, отд. биол. – 1940а. – Т. 49, № 1. – С. 61-70.
24. Цалкин В.И. Материалы к биологии морской свиньи (*Phocaena phocaena relicta* Abel) Азовского и Черного морей // Зоол. журн. –1940б. – Т. 19, Вып. 1. –С. 160-171.
25. Яблоков А.В., Белькович В.М., Борисов В.И. Киты и дельфины. –М.: Наука, 1972. –472с.
26. Androukaki E., Tounta E. A Study of the distribution and pathology of cetaceans in Greece // European Azov // European research on cetaceans. — Kiel: ECS, 1997. – Vol. 10. – P. 200–203.
27. Arctander P., Comparison of a mitochondrial gene and a corresponding nuclear pseudogene // Proc. R. Soc. Lond. B. – 1995. – Vol. 262. – P. 13-19.
28. Bachmann L., Schibel J.M., Raab M., Sperlich D., Satellite DNA as taxonomic marker // Biochem. Syst. Ecol, 1993. – Vol. 21, No 1. – P. 3-11.
29. Ballard J. W., Whitlock M. C. The incomplete natural history of mitochondria // Molecular Ecology. – 2004. – Vol. 13. – P. 729-744.
30. Bensasson D., Zhang D. X., Hartl D.L., Hewitt G. M. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. // Trends in Ecology and Evolution. – 2001. – Vol. 16. – P. 314-321.
31. Birkun A., Jr., Kuiken T., Krivokhizhin S. etc. Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (*Delphinus delphis ponticus*) from the Black sea // Veterinary Record. –1999. – Vol. 144, No 4. – P. 85–92.
32. Boursot P., Din W., Anand R. Origin and radiation of the house mouse: mitochondrial DNA phylogeny // J. Evol. Biol., 1996. –Vol. 9. – P. 391-415.
33. Bossart, G.D., S.J. Decker and R.Y. Ewing. Cytopathology of cutaneous viral papillomatosis in the killer whale (*Orcinus orca*). IN: Molecular and Cell Biology of Marine Mammals. Editor: C.J. Pfeiffer. Melbourne, FL, Krieger Publishing, 2002. – P. 213-224.

34. *Brown W.M., Gerge M.L., Wilson A.C.* Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // *Proceeding of the National Academy of Sciences USA.* – 1979. – V. 76. – P. 1967-1971.
35. *Brown W.M., Prager E.H., Wang A., Wilson A.C.* Mitochondrial DNA sequences of primates; tempo and mode of evolution // *J.Mol. Evol.* – 1982. – V. 18, N 1. – P. 225-239.
36. *Cetacean societies: Field studies of dolphins and whales* (Ed. by Mann J., Connor R.C., Tyack P.L., Whitehead H.) // *Chicago: The University of Chicago Press* – 2000. – 433p.
37. *Connor R.C, Mann J., Tyack P.L. and Whitehead H.* Social evolution into toothed whales // *Trends Ecol. Evol.* – 1998 – V. 13 – P. 228-32.
38. *Deborah A. Duffield, William Amos* Genetic Analyses. – 2001. – P. 271–281.
39. *Michelle Lynn Reddy Leslie A. Dierauf Frances M. D. Gulland* // *Marine Mammals as Sentinels of Ocean Health.* – 2000. – P. 97–115.
40. *Miller, Debra Lee, Ruth Y. Ewing and Gregory D. Bossart.* Chapter 2: Emerging and resurging diseases. IN: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine.* Editors: Leslie A. Dierauf and Frances M. D. Gulland. Boca Raton, FL, CRC Press, c 2001. – P. 15-30.
41. *Ranneft M.D., Eaker H.W., Davis R.M.* Aguideto the pronunciation and meaning of cetacean taxonomic names // *Aquatic Mammals.* – 2001. Vol. 27, No. 2. – 185 p.
42. *Rosel P.E., Dizon A.E., Heyning J.E.* Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (genus *Delphinus*) // *Marine Biology.* – 1994. – Vol. 119. – P. 159-167.
43. *Smith T.* Current understanding of the status of the porpoise population in the Black Sea // *Mammals in the seas, Vol. 4.* – *FAO Fisheries Series.* – 1982. – Vol. 5, No 4. – P. 121-130.
44. *Van Beneden T.J.* La mer Noire et ses Cetaces vivants et fossiles // *Proc. Congr. Intern. Zool., Deuxieme sess.* – *Moscou, 1892.* – Prem. part (цит. по: Клейненберг 1956).

45. *Walsh P., Metzger D., Higuchi R.* (1991) ChelexR 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. - *Bio Techniques*, V.10, No 4. – P. 506- 513.
46. *Zaitsev Yu., Mamaev V.* Marine biological diversity in the Black Sea: a study of change and decline. – New-York: United Nations Publ., 1997. – 208 p.