

УДК 575.17:597.553.2

РАЗРАБОТКА НОВЫХ МАРКЕРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КАМЧАТСКОЙ МИКИЖИ *PARASALMO (ONCHORHYNCHUS) MYKISS*

С.Д. Павлов, М.Н. Мельникова, А.Л. Сенчукова, Е.А. Пивоваров

(кафедра ихтиологии биологического факультета МГУ; e-mail: melnik-06@mail.ru)

Для популяционно-генетического анализа камчатской микижи *Parasalmo (O.) mykiss* разработаны две новых маркерных системы: SCAR-маркеры (Sequence Characterized Amplified Region) и ISSR-маркеры (Inter Simple Sequence Repeats или inter-microsatellite-PCR). Обе системы демонстрируют высокий уровень вариабельности и, несмотря на исходную видоспецифичность, могут применяться для популяционно-генетического анализа лососевых видов рыб со сложной внутривидовой структурой.

Ключевые слова: микижа, лососевые рыбы, маркеры, генетический анализ популяций.

Камчатская микижа *Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* является пластичным высокополиморфным видом лососевых рыб, отличающимся сложной популяционной структурой. Генетическое разнообразие вида на североамериканском и азиатском участках ареала изучено неравномерно. Наряду с многочисленными работами, посвященными генетике различных форм микижи Северной Америки (и их интродуцентов, выращиваемых и распространенных по всему миру), популяционно-генетические исследования азиатской группы *P. (O.) mykiss* невелики [1–3].

Исследование особенностей генома этого вида показали, что большинство маркеров, широко используемых в генетических исследованиях североамериканских форелей, малоэффективны или просто непригодны для микижи в азиатской части ареала. Очевидно, что дальнейшее исследование генетического разнообразия вида требует разработки новых маркерных систем и методик поиска подходящих популяционно-генетических маркеров. Нами были использованы SCAR-маркеры и ISSR-маркеры, подобранные по достаточному для популяционного анализа уровню видоспецифичного полиморфизма [3].

SCAR-маркеры [4], берущие начало от полиморфных RAPD-маркеров, лишены большинства их недостатков и применимы для разнообразных исследований. Для получения локус-специфичных маркеров интересующий фрагмент экстрагируют из геля, клонируют и секвенируют. На основе полученной нуклеотидной последовательности подбирают длинные высокоспецифичные праймеры, которые амплифицируют единичный фрагмент с высокой степенью воспроизводимости.

ISSR-маркеры [5] — это межмикросателлитные участки, амплифицированные с использованием мик-

росателлитных локусов как участков отжига праймеров. Праймеры состоят из повторяющейся последовательности и “якорного” участка на 5' или 3' конце, который определяет место отжига праймера. Такой подход увеличивает точность отжига, воспроизводит амплифицированных фрагментов и уменьшает “анонимность” амплифицируемых участков. Праймеры подбирались нами по ранее выявленным у микижи микросателлитным последовательностям.

Целью настоящей работы явилась проверка результативности использования данных маркерных систем для популяционно-генетического анализа микижи.

Материал и методы

Материал был собран от разных форм *Parasalmo (O.) mykiss*, обитающих в наиболее крупных реках и водных бассейнах западной и восточной Камчатки, чилийской микижи, а также североамериканских популяций. Учитывая, что данный вид представлен разными эпигенетическими вариациями, в анализ были включены особи речной (резидентной) и проходной форм. Принадлежность к той или иной форме подтверждалась анализом чешуи и содержанием Sr/Ca в отолидах. Всего было исследовано 7 популяций *O. mykiss* (речная и проходная формы из рек Сопочная и Утхолок с западного побережья Камчатки, речная форма из р. Жупанова с восточного побережья, рыбозаводная выборка микижи из Чили, североамериканская микижа: прибрежная — coastal и материковая — inland формы; в качестве репера был использован наиболее близкий к микиже вид *Oncorhynchus tshawytscha*). В каждую выборку было отобрано по 21 экзemplяру.

ДНК выделяли из замороженной мышечной ткани стандартным методом, включающим лизис клеток 3%-м саркозилем Na, инкубацию лизата с протеиназой K и депротеинизацию смесью фенол—хлороформ и хлороформ—изоамиловый спирт. Амплификацию SCAR-маркеров проводили по полученным ранее в нашей лаборатории семи парам SCAR-праймеров следующих последовательностей: 1) cccggcaccctacaggctgaattcg и tgaggcgca (t отжига 65°), 2) tgatgtcacctgtgcccttaattg и cactgcactctgggaagcctaact (t отжига 65°), 3) gccttctttggcgaacattgtaaaacctcc и gcaatactagtgtttaagctacttttga (t отжига 65°), 4) ccctagtcttttggttgaattcg и actggagtggagcaaatgttagcg (t отжига 68°), 5) ctggaggctaagaggacgagagga и ttctagtggctcagtgtgggtca (t отжига 71°), 6) ccgtctcctctctgatagctgtgc и ggccttctttgtctattctctcac (t отжига 65°), 7) gtgtattctccatctcccctctgt и ttcttttggttgctgactatagcg (t отжига 65°).

Амплификацию при ISSR-анализе проводили с ранее подобранными ISSR-праймерами: 1) (cag)7t (t отжига 69°), 2) (cag)5 (t отжига 62°), 3) (tga)6tc и (agac)4agat (t отжига 63°), 4) (agac)4agat (t отжига 66,5°). Реакцию проводили в объеме 25 µl 0,01 M буфера Tris-HCl, pH 8,3, содержащего 0,05 M KCl, смесь четырех dNTP (0,1—0,2 mM), MgCl₂ (5mM), двух или одного праймеров по 2 µl на пробу, Smart-Taq ДНК-полимеразы (Диалат, Россия) и 100 нг исследуемой ДНК. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующим программам: 1) для SCAR-маркеров — “горячий старт” 94° — 5 мин, (94° —

1 мин, t° отжига — 1 мин, 72° — 1 мин) × 35 циклов; 2) для ISSR-маркеров — “горячий старт” 94° — 5 мин, (94° — 45 с, t° отжига — 45 с, 72° — 45 с) × 40 циклов.

Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в агарозном геле (GenePure LE, BioExpress) в TBE буфере. В качестве маркеров молекулярного веса использовали 1 kb “Ladder” фирмы “СибЭнзим”, Россия. Гель окрашивали 0,05% бромистым этидием, промывали водой и анализировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

При использовании, сконструированных нами уникальных SCAR-праймеров амплифицировался единственный фрагмент по размеру чуть меньше исходного полиморфного RAPD-фрагмента. Для контроля амплификации мы использовали фрагмент гена 18 S RNA. Проверка полученных маркеров, имеющих полиморфизм по GenBank, показала, что ни одна из последовательностей не имеет выраженного сходства с представленными в нем последовательностями. Все полученные SCAR-маркеры обладают высоким межпопуляционным полиморфизмом, хорошо сочетающимся с географическим положением популяций.

На рис. 1 видно, что SCAR-маркер, присутствующий у 82% индивидов из р. Коль, присутствует только у 33% индивидов из р. Жупанова.

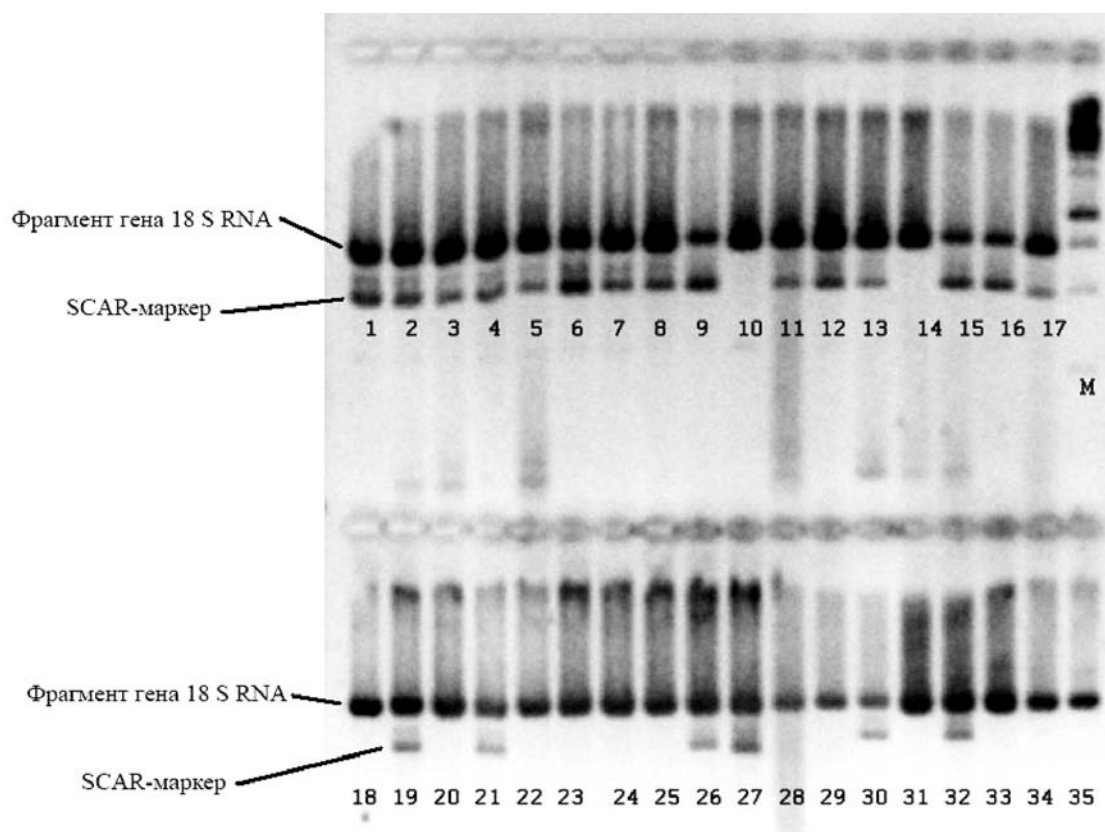


Рис. 1. Полиморфный SCAR-профиль: (1—17) микижа из р. Коль (западное побережье Камчатки, (18—35) микижа из р. Жупаново (восточное побережье Камчатки). Маркер 1 kb SibEnzim

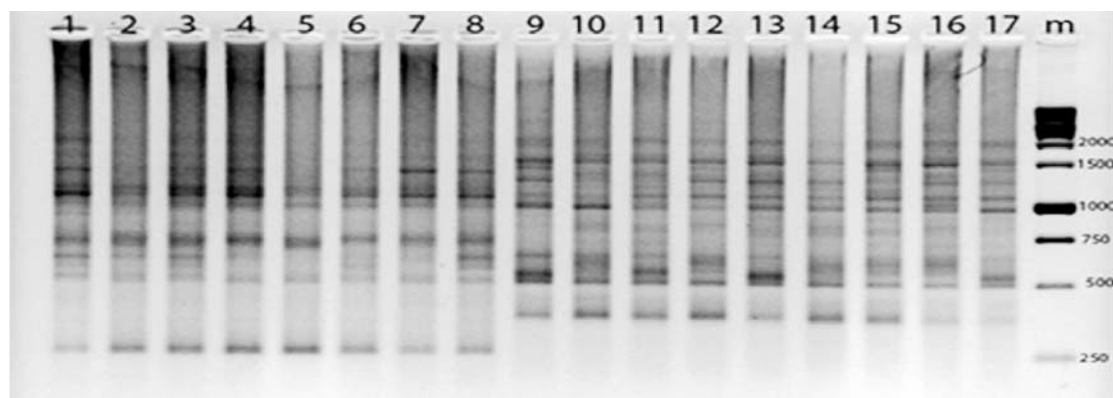


Рис. 2. Пример полиморфного ISSR-профиля: (1—8) микижа из р. Седанка (западное побережье камчатки), (9—16) микижа из р. Жупанова (восточное побережье Камчатки), m — маркер 1 kb

Проведя предварительный анализ отношений между тестовыми выборками с помощью различных методов, мы получили отношения, хорошо коррелирующие с географической локализацией исследуемых популяций. При оценке популяционных отношений методами объединения соседей (Neighbour joining, NJ) и UPGMA образовывались два крупных кластера, уверенно поддерживаемых бутстреп-анализом (100%). Один из них включал в себя североамериканскую микижу (материковую и прибрежную формы), а также чилийскую форель. Близость чилийской и североамериканской групп хорошо объясняется тем, что многие реки Чили зарыблялись как раз североамериканской форелью. Другой кластер включает в себя популяции с западного побережья Камчатки. Популяция с восточного побережья Камчатки (микижа из р. Жупанова) отличается по данным маркерам от рек западного побережья и находится ближе к североамериканским форелям.

При анализе тех же популяций микижи по четырем ISSR-локусам были получены профили, также указывающие на достаточно высокие популяционно-генетические различия у камчатской микижи (рис. 2) Характер отношений между популяциями, выявляемый методами NJ и UPGMA, в целом сходен с таковыми, полученными при анализе SCAR-

маркеров. В один из образующихся кластеров входят популяции из рек западного побережья Камчатки, а во второй — материковая и прибрежная формы североамериканской микижи, микижа из р. Жупанова с восточного побережья Камчатки и чилийская форель.

Таким образом, можно утверждать, что SCAR- и ISSR-маркеры могут быть высоко результативны при исследованиях больших выборок камчатской микижи и других лососевых видов. Более подробно отношения между камчатскими и другими популяциями вида *Parasalmo (O.) mykiss* будут рассмотрены в последующих работах. Однако уже очевидно, что новые маркерные системы, не используемые ранее для лососевых рыб, помогут в решении многих спорных вопросов при популяционно-генетическом анализе сложнокомплексных видов.

* * *

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 08-04-01217), грантом “Научные школы” (НШ-2104.2008.4) и грантом Федерального агентства по науке и инновациям в рамках ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (госконтракт 02.740.11.280).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Осинев А.Г., Павлов С.Д. О генетическом сходстве камчатских благородных лососей и американской радужной форели // Вопр. ихтиологии. 1993. Т. 33. № 5. С. 626—630.
2. Павлов С.Д. Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция тихоокеанских форелей (род *Parasalmo*) Западной Камчатки // Генетика. 2000. Т. 36. № 9. С. 1251—1261.
3. Melnikova M.N., Pavlov S.D., Antipova N.V. Design and study of SCAR-markers for populations Mykizha On-

corhynchus (*Parasalmo*) mykiss from Kamchatka land // Electronic J. of Ichthyology. 2008. N 2. P. 67—75.

4. Paran J., Michelmore R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce // Theor. Appl. Genet. 1993. N 85. P. 985—993.

5. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. Vol. 20. N 2. P. 176—183.

Поступила в редакцию
17.04.2010.

THE DEVELOPMENT A NEW SYSTEM OF GENETIC MARKERS FOR KAMCHATKAN MYKISS (*PARASALMO (O.) MYKISS*)

S.D. Pavlov, M.N. Melnikova, A.L. Senchukova, E.A. Pivovarov

A new SCAR- and ISSR-gene marker systems, were created for genetic analysis of populations of kamchatka mykiss *Parasalmo (O.) mykiss* and other salmonides. Both systems has demonstrated a high level of variability between newborn populations of mykiss, but can used for analysis in other salmonides with complex structure of populations.

Key words: *mykiss, salmonides, markers, genetic analysis of populations.*

Сведения об авторах

Павлов Сергей Дмитриевич — канд. биол. наук, доц. кафедры ихтиологии МГУ биологического факультета МГУ. Тел. 939-37-92; e-mail: serge_pavlov@mail.ru

Мельникова Марина Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры ихтиологии биологического факультета МГУ. Тел. 939-47-67; e-mail: melnik-06@mail.ru

Сенчукова Анна Леонидовна — студентка 5-го курса кафедры ихтиологии биологического факультета МГУ. Тел. 939-47-67; e-mail: anechka-dzhins@mail.ru

Пивоваров Евгений Александрович — инженер кафедры ихтиологии биологического факультета МГУ. Тел. 939-47-67; e-mail: bio-msu@mail.ru