

УДК 597.963.576.11

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАРКЕРОВ КАК СВИДЕТЕЛЬСТВО АДАПТИВНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ МАЛЬМЫ (*SALVELINUS ALPINUS* × *S. MALMA COMPLEX*) КУРИЛЬСКИХ ОСТРОВОВ

Е.А. Шубина¹, М.А. Никитин¹, Е.В. Пономарева¹, О.Ф. Гриценко²¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ;²Всероссийский НИИ рыбного хозяйства и океанологии (ВНИРО). г. Москва;

e-mail: shubina@genebee.msu.su)

Поиск в GenBank последовательностей, использованных в качестве филогенетических признаков при анализе популяционной структуры гольцов Курильских островов, показал, что все они по меньшей мере экспрессируются либо являются участками структурных генов. Такой характер маркеров позволяет предполагать адаптивный характер их консервативного наследования.

Ключевые слова: гольцы, структура популяций, RAPD-маркеры, BLAST.

Природа молекулярных маркеров, получаемых методом сравнения полиморфизма длин случайно амплифицированных фрагментов ДНК (RAPD-PCR) и широко используемых в популяционно-генетических и микроэволюционных исследованиях, обычно остается неизвестной. Отсюда возникают вопросы о соотношении адаптивных процессов (естественного отбора и дрейфа генов) эффекта немногочисленных основателей [1, 2]. Ранее при определении родственных связей между различными изолированными и проходными популяциями гольцов *Salvelinus alpinus*—*malma complex* трех северных и двух южных Курильских о-вов методом RAPD-PCR были получены результаты, свидетельствующие о соответствии дивергенции геномов изолятов и проходных форм в данном ареале клинальной изменчивости по меристическим признакам. Наши данные позволили исключить дрейф или эффект основателя в чистом виде и показали ограниченное влияние потока генов между соседними островами [3]. Диагностическая нуклеотидная последовательность одного из озерных изолятов о. Онекотан с высокой достоверностью соответствовала участку экспрессируемой ДНК, полученной из жабер атлантического лосося *Salmo salar* [4]. Нами была поставлена задача получения более подробной информации о молекулярной природе последовательностей, выявляемых в использованной системе праймеров.

Материалы и методы

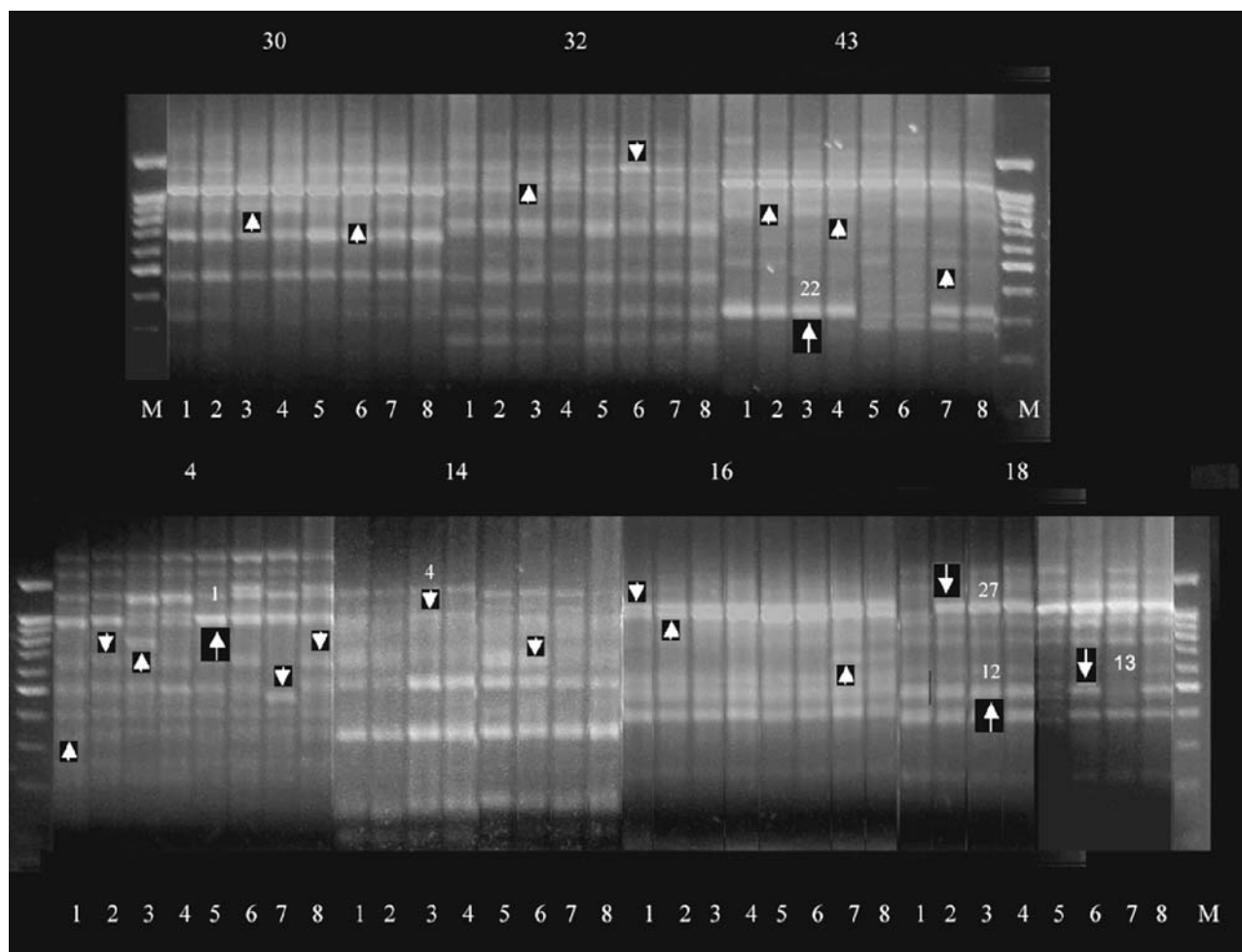
ДНК была выделена из 8 образцов гольцов с о. Парамушир (Северные Курильские острова), принадлежащих к четырем выборкам (по 2 образца из каждой): оз. Б. Черное — озерная жилая форма, ру-

чей Северянка — ручьевая жилая форма, оз. М. Черное — озерная жилая форма и р. Чайка — проходная речная форма. Реакции RAPD-PCR с двумя 20-нуклеотидными праймерами [5] проводили, как описано ранее [3]. Для секвенирования соответствующие амплификаты после очистки в агарозном геле клонировали в *E. coli* с помощью InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва). Для поиска гомологичных последовательностей в базе данных dbEST из ресурсов NCBI использовали программы BLAST и BLASTN discontinuous. Все найденные гомологичные последовательности имели очень низкую вероятность случайного сходства.

Результаты и обсуждение

Для определения нуклеотидных последовательностей были отобраны мажорные вариабельные RAPD-PCR фрагменты (рисунок); перечень наиболее интересных результатов приведен ниже.

Фрагмент 22 (длина 274 н.п.) показал 85%-ю идентичность с клоном кДНК из смеси тканей *S. salar*. Эта последовательность предположительно относится к гену транскрипционного фактора NF- κ B — белка, активирующего экспрессию генов (GenBank EG 760735). Участок сходства находится между 127 и 225 нуклеотидами, фрагмент 22. Несмотря на жизненную необходимость этого гена, у некоторых индивидуумов фрагмент 22 отсутствовал, очевидно, в результате замен в области связывания праймеров. Фрагмент 12 (рисунок) имеет длину приблизительно 458 н.п. При трансляции данного фрагмента была обнаружена значимая и протяженная гомология с гипотетическим вариабельным белком длиной 659 аминокислот рыб *Danio rerio* (XP_001332830) и *S. salar*. При сравнении с клонами кДНК разных



Электрофоретическое разделение фрагментов — продуктов RAPD-PCR. Номера в верхней части электрофоретических паттернов обозначают сочетание пар праймеров [4]. Порядковые номера в нижней части каждой реакции (1—8) относятся к образцам ДНК (см. “Материалы и методы”). Крупные стрелки с проставленными номерами указывают на описанные в настоящей работе фрагменты. Мелкими стрелками обозначены остальные проанализированные фрагменты. Маркер — 100 bp ladder + 1500 bp (СибЭнзим, Россия)

видов лососевых рыб: *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, *Thymallus thymallus*, *O. tshawytscha*, *Salvelinus fontinalis*, *Coregonus clupeaformis* на участке от 216 до 412 нуклеотида обнаруживает 80%-е сходство. Около 10% клонов содержали плазмиды с длиной вставки 500 п.н. На участке перекрытия с основным типом клонов эти последовательности полностью совпадали. Кроме того, при скрининге плазмидных ДНК были обнаружены клоны третьего типа с длиной вставки 384 н.п. Вероятнее всего, они появляются в результате делеции части фрагмента, содержащего шпильку, при клонировании в бактериальном реципиенте. Третий тип последовательностей проявляет гомологию с геном гуанидинсвязывающего белка гена *Salmo salar* (номер в GenBank DQ156149). Таким образом, фрагмент 12 (рисунок) представляет собой смесь по меньшей мере двух различных матриц с одинаковой электрофоретической подвижностью.

Основная часть ДНК, находящаяся в зоне электрофоретической подвижности фрагмента 27 (длина ~ 1200 н.п.), на 84% сходна с геном гуанидинсвязывающего

белка *S. salar*. Гомология с геном этого же белка была ранее установлена для минорной фракции фрагмента 12. Оба фрагмента являлись продуктами амплификации в одной и той же реакции с одним и тем же сочетанием праймеров, однако гомология в нуклеотидной последовательности между ними отсутствует. Это объясняется, по-видимому, различным расположением участков амплификации на протяженной уникальной последовательности гена. Таким образом, два отличающихся по электрофоретической подвижности фрагмента оказались участками одного и того же гена.

Минорная фракция этого же фрагмента обнаружила сходство с геном тиреоидного гормона *S. salar* (GenBank № EG870408 и EG849746) — 95% гомология, почти 100%-я значимость.

Мажорная фракция ДНК фрагмента 13 длиной 280 н.п. показала сходство (идентичность 86%, вероятность совпадения 8^{-90}) с целым семейством генов *Oncorhynchus mykiss*, входящих в состав большого комплекса гистосовместимости (SYPG1, PHF1, RGLII гены), псевдогеном ДНКазы II, и др.

Для фрагмента 1 длиной 905 н.п. наибольшая гомология была найдена с участком генома *D. rerio*: клоном DKEY-182H7 в группе сцепления 7 (GenBank № BX663609.29) и мРНК предсказанного белка, подобного переносчику норэпинефрина (аналога норадреналина) (GenBank № XM 689046.3). Транслированная последовательность фрагмента 1 из 42 аминокислот сходна с 101 аминокислотными последовательностями, размещенными в GenBank. Все эти белковые гомологии относились к высококонсервативным участкам переносчиков нейромедиаторов из различных организмов от *Homo sapiens* до *Drosophila melanogaster* и *Strongylocentrotus purpuratus*. Нуклеотидная последовательность *D. rerio* длиной 2115 нуклеотидов, гомологичная фрагменту 1, была извлечена из GenBank (LOC565776). Фрагмент 1 захватывает экзон 13-го гена и 527 нуклеотидов предшествующего интрона. Высокой степенью гомологии у гольцов и *Danio* обладают лишь консервативные экзонные (транслируемые) последовательности. При сравнении последовательностей 13-го интрона, выделенного из ДНК различных популяций мальмы, было обнаружено, что сравниваемые последовательности одинаковы практически на всем протяжении и состоят из перекрывающихся повторов с шагом около 50 н.п. По всей вероятности, интрон 13 представляет собой минисателлит. Если при расшифровке полной последовательности будут обнаружены уникальные участки, этот интрон перс-

пективен как маркер при микроэволюционных исследованиях.

Кроме перечисленных был проанализирован еще ряд фрагментов. Для некоторых из них гомологий в GenBank обнаружить не удалось. Таковы, например, минорная фракция фрагмента 13 и фрагмент 4. Для большинства остальных анализировавшихся фрагментов гомологии в базах EST были найдены, но с более низким уровнем.

Таким образом, анализ популяционной структуры гольцов Курильских островов [3] был проведен на основе маркеров, являющихся в значительной степени участками структурных генов, нуклеотидные последовательности которых представлены в GenBank. Это позволяет предполагать адаптивный характер их консервативного наследования. Ранее сообщалось об отсутствии корреляции между географическими и генетическими дистанциями, полученными при анализе популяционной структуры мальмы с помощью аллозимных маркеров [6]. Мы полагаем, что этот результат подтверждает важную роль естественного отбора в эволюции островных популяций мальмы.

* * *

Работа была организована и поддержана ВНИРО и Федеральной целевой программой Федерального агентства по образованию (Государственный контракт № П2361).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barton N.H. Natural selection and random genetic drift as causes of evolution on islands // Phl. Trans. R. Soc. Lond. B. 1996. Vol. 351. P. 785–795.
2. Schluter D. Ecology and the origin of species // TREE. 2001. Vol. 16. N 7. P. 372–380.
3. Шубина Е.А., Пономарева Е.В., Гриценко О.Ф. Генетическая структура гольцов рода *Salvelinus* из водоемов Курильских островов // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 12. С. 1647–1665.
4. Шубина Е.А., Пономарева Е.В., Гриценко О.Ф. Популяционно-генетическая структура гольцов Северных Ку-

рильских островов и положение мальмы в системе рода *Salvelinus* (Salmonidae, Teleostei) // Журн. общ. биол. 2006. Т. 67. № 4. С. 280–298.

5. Welsh I., McClelland M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers // Nucl. Acid Res. 1991. Vol. 19. P. 5275–5279.

6. Омельченко В.Т., Салменкова Е.А., Шедько С.В. Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция мальмы (*Salvelinus malma* Walbaum) Курильских островов // Генетика. 2002. Т. 38. № 9. С. 1259–1269.

Поступила в редакцию
13.04.10.

CHARACTERIZATION OF MOLECULAR MARKERS AS EVIDENCE OF ADAPTIVE EVOLUTION OF *SALVELINUS ALPINUS* × *S. MALMA* COMPLEX POPULATIONS OF KURIL ISLAND

E.A. Shybina, M.A. Nikitin, E.V. Ponomareva, O.F. Gritzenko

BLAST Search of the markers used for Kuril Island Dolly Varden population structure studies revealed homologies of these markers either with structural genes or at least with expressed sequences from dbEST resources of GeneBank. Such nature of markers allows to suppose the adaptive character of their evolution.

Key words: Dolly Varden Charr, population structure, RAPD-markers, BLAST.

Сведения об авторах

Шубина Елена Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела эволюционной биохимии НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел. +7(495)939-14-40; e-mail: shubina@genebee.msu.su

Никитин Михаил Александрович — мл. науч. сотр. отдела эволюционной биохимии НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел. +7(495)939-14-40.

Пономарева Екатерина Валериановна — канд. биол. наук, науч. сотр. отдела эволюционной биохимии НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел. +7(495)939-14-40.

Гриценко Олег Федорович — докт. биол. наук, зав. отделом Ресурсов дальневосточных морей Всероссийского НИИ рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО г. Москва). Тел. +7(499)264-86-83; e-mail:Gritzenko@vniro.ru