

# НОВЫЕ ДАННЫЕ О ГЕНЕТИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ КАМЧАТСКОЙ МИКИЖИ *PARASALMO (O.) MYKISS*

С.Д. Павлов, М.Н. Мельникова, Н.В. Антипова

Кафедра ихтиологии Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова  
(МГУ)

*New data about genetic diversity of Kamchatka mykiss *Parasalmo (O.) mykiss**

S.D. Pavlov, M.N. Mel'nikova, N.V. Antipova

Ichthyology department of Moscow State University

Данное исследование является продолжением работ по оценке внутривидовой изменчивости на уровне генома ДНК у камчатской географической группы *Parasalmo (O.) mykiss*, первые результаты которого доложены в предыдущих работах. (Павлов и др., 2001; Павлов и др., 2004).

С помощью рестриктного анализа ДНК и фрагментарного секвенирования был расширен анализ изменчивости мт-ДНК за счет оценки варибельности генов *cytb*, *ND3*, *ND4*, *ATP6*, *ATP8*, участка *D-loop* и других сайтов. К настоящему времени проанализировано около 30% мт-генома у различных камчатских популяций этого вида. Исследованы выборки от 25 разных популяций камчатской микижи, включая североамериканские реперные выборки. На основании проведенных исследований можно сделать следующие заключения, подтверждающие предварительные выводы предыдущих лет.

- камчатские популяции вида обнаруживает чрезвычайно низкий уровень изменчивости на уровне митохондриального генома по отношению к североамериканским популяциям вида.
- учитывая полученные ранее электрофоретические данные, камчатскую географическую группу микижи можно охарактеризовать как монофилетическую, имеющую низкую дивергенцию на популяционном уровне и низкий уровень разнообразия большей части всего генома.
- митохондриальный геном у камчатских популяций микижи резко обеднен и малоперспективен для дальнейших исследований популяционного уровня.

Был начат анализ генетической изменчивости ядерной ДНК по генам гормона роста (гормон роста I; гормон роста II) общей протяженностью 10264 bp, а также гена *Rag3*. По литературным данным, эти гены несут достаточный потенциал для анализа популяционной изменчивости у многих лососевых, могут отражать генетическую детерминацию у различных экоформ.

К настоящему моменту проведен рестриктный анализ 9 рестрикционным эндонуклеазам (*Hind III*, *Msp I*, *Rsa I*, *Bsp143 I*, *Hinf I*, *Hha I*, *Tru1 I*, *Tag I*, *BsuR I*).

В тестовую выборку включено 24 особи микижи от различных экоформ с восточного и западного побережий камчатки, резидентная формы с Шантарских островов. В качестве репера было использовано несколько образцов североамериканских форелей (генетическая линия *coastal*).

Всего поставлено 304 амплификации с различными комбинациями праймеров.

Обнаружены одиночные мутации по гормону роста II, на участке интронов D и C. В настоящий момент, результаты проверяются на расширенной выборке. Однако, очевидно, что данные сайты ДНК недостаточно вариабельны для популяционно-генетических исследований микижи.

Произведен поиск новых генетических маркеров при условии обедненности генома. После подбора подходящих для этой задачи методов, оптимальным оказался метод RAPD, где с помощью неспецифичных двойных и одиночных праймеров, оценивается общая гетерогенность у исследуемых популяций. Затем отбираются наиболее перспективные для

дальнейшего анализа участки ДНК; которые после этого выделяются и подготавливаются к секвенированию.

Модификация метода полимеразной цепной реакции с двумя случайными праймерами (AP-RAPD; Welsh I., McClelland M. 1991) дает достаточное количество паттернов, отвечающих этой задаче. Функции таких последовательностей в геномах неизвестны, но это не исключает возможности их использования в роли генетических маркеров популяций.

Отобранная тестовая выборка микижи включала 24 особи из пяти камчатских популяций *Parasalmo (O.) mykiss* (речная и проходная формы из реки Сопочная, западное побережье Камчатки; речная форма с восточного побережья; микижа Шантарских островов; охотоморская выборка семги). В качестве репера были взяты образцы североамериканских микижи (генетической линии coastal).

В рамках эксперимента использовались различные сочетания 21-го и 19-членных праймеров (таблица).

RAPD-праймеры, использованные в исследовании

№	5'-3' последовательность	Длина
1	gaggattgtggccttctttg	20
2	gctagtattgctcagcgg	19
3	taatacgactcactataggg	20
4	atgctttggwacacacctcgt	22
5	cgttcactgcttcgggatt	19
6	tcataaccctggcttccttg	20
7	gcacatttacgattcctagtgg	22
8	gcctaataatatatatattgg	23
9	gggccctgtctcagctgggga	21
10	tggcctggctgccctgagcag	21
11	gatcatgccattgcactcta	20
12	acagaagtctgggatgtgga	20
13	actaggcctcacctgataca	20
14	gttgtaatgcagtcctcctg	20
15	ctactaaggcttcttgggag	21
16	actactaaggcttcttgggaa	22
17	cagtgccaaactgagaatttgg	21
18	ttacatatgagccttcctg	19
19	gttgatcatcagactttgacc	20
20	ttcagttcatatggaccaga	20
21	gccatttgttcagtgggtcg	20
22	taatacgactcactataggg	20
23	agctcttattcgctgatggta	21
24	atttaggtgacactatagaa	20

Амплификацию проводили по стандартной схеме, подбирая температуру отжига для каждой пары праймеров, в соответствии с их последовательностями. Всего было проведено 500 амплификаций. При этом толь лишь некоторые праймеры обнаруживали полиморфзм (рисунок).

По пяти парам праймеров получены гетерогенные продукты имеющие популяционный характер различий. Эти фрагменты (размером от 100 до 800 bp) вырезали из геля, выделили из них ДНК и секвенировали. Выяснилось, что большинство из них состоит из нескольких последовательностей ДНК, имеющих одинаковую длину

(подвижность в электрофорезном поле), относящихся к так называемой «группе средних повторов». Для разделения и локализации этих последовательностей был применен метод ТА-клонирования с помощью плазмидного вектора, лигирования и трансформации исходной ДНК в штамм E.coli. Клонированные фрагменты секвенировали с двух сторон, используя праймеры, имеющиеся в плазмиде. К полученным последовательностям подбирали праймеры и амплифицировали геномную ДНК еще раз.

Пример проявления гетерогенности, носящей популяционный характер, в выборках при использовании комбинации из двух RAPD-праймеров. Обозначения: 1, 2, 5, 6: проходная форма из реки Сопочная (западная Камчатка); 3, 4, 7, 8: пресноводная форма из реки Сопочная (западная Камчатка); 9, 10: микижа из реки Жупанова (восточная Камчатка); 11, 12, 13, 14, 15, 16: микижа Шантарских островов; 17, 18, 19, 20: охотоморская выборка семги.

Некоторые из подобранных праймеров находятся на стадии проверки, другие дают воспроизводимые результаты и могут уже сейчас быть использованы в качестве генетических маркеров для микижи. В настоящий момент проводится сравнительный анализ полученных фрагментов с имеющимися в Gene bank частями генома и проверка работы выделенных генетических маркеров на больших выборках.

#### Литература

Павлов С.Д., Колесников А.А., Мельникова М.Н., Ушакова М.В. 2004. Генетическая дивергенция камчатской микижи (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss*) на ареале по результатам рестрикционного анализа и секвенирования гена цитохрома b mt-ДНК // Генетика. Т.40. №12. С.1695-1701.

Welsh I., McClelland M. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers // NAR. Vol.19. P.5275-5279.