

наборы аллелей, характерные для выборок жаростойких и нежаростойких инбредных линий кукурузы.

Проанализовані дані про структуру генів кукурудзи, що кодують білки теплового шоку. Досліджений молекулярно-генетичний поліморфізм генів *uaz171*, *hsp3* і *hsp90*, до складу яких входять мікросателітні повтори. Встановлені набори алелів, характерні для вибірок жаростійких і нежаростійких інбредних ліній кукурудза.

Information about the structure of maize genes encoding the heat shock proteins is analysed. Molecular-genetic polymorphism of genes *uaz171*, *hsp3* and *hsp90* containing microsatellite repeats is investigated. The alleles sets characteristic for samplings of the heat-resistant and unheat-resistant inbred lines are defined.

**МЕЛЬНИКОВА М.Н., ПАВЛОВ С.Д., АНТИПОВА Н.В.**

*Московский Государственный Университет, биологический факультет, кафедра ихтиологии,*

*119899 Россия, Москва, Ленинские Горы 1, стр.12. e-mail: melnik-06@mail.ru*

### **ПОЛИМОРФНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В ПОПУЛЯЦИЯХ КАМЧАТСКОЙ МИКИЖИ (*PARASALMO (O.) MYKISS*)**

Камчатская микижа (*Parasalmo (O.) mykiss*) является объектом красной книги, а ее жилая форма (микижа, радужная форель (rainbow trout)) один из наиболее ценных объектов мирового рыбоводства. В то же время, статус этого вида дискусионен, единого мнения о его родовой принадлежности не существует; разные авторы относят микижу к родам *Salmo*, *Parasalmo* или *Oncorhynchus*. Некоторые ученые по-прежнему полагают, что камчатская семга и жилая микижа не две формы одного и того же вида, а разные виды. Продолжению этой дискуссии способствует чрезвычайная высокая экологическая пластичность микижи. На камчатском полуострове этот вид образует не только проходную и жилую формы но целый ряд промежуточных между ними форм.

Все это, а также то, что только в Азии тихоокеанские лососи представлены единственными сохранившимися в мире дикими популяциями, места обитания которых находятся в труднодоступных районах, делает их уникальным объектом для проблем происхождения группы, микроэволюции, структуры вида и видообразования.

Данное исследование является продолжением работ по оценке внутривидовой изменчивости на уровне генома ДНК у камчатской географической группы *Parasalmo (O.) mykiss*, первые результаты которого описаны в предыдущих работах авторов [1].

Рестриктный анализ и секвенирование фрагментов мт-ДНК (гены *cytb*, ND/3, ND/4, ATF 6, ATF 8, части D-loop) обнаружили низкий уровень изменчивости митохондриальной ДНК камчатских популяций микижи по сравнению с американскими популяциями и оказались неперспективными для дальнейших исследований популяционного уровня. Анализ генетической изменчивости ядерной ДНК, включающий в себя секвенирование спейсеров рибосомальной ДНК и рестриктный анализ мелкощепящими эндонуклеазами гормонов роста I и II обнаружил единичные мутации. Стало очевидно, что представленные в литературе данные по варибельным участкам генома у американских форелей и дающие генетическую детерминацию популяций у других организмов не дают результатов в применении к монофилитичной камчатской группе *Parasalmo (O.) mykiss*.

Более перспективным показалось использование в качестве маркерных систем полиморфных последовательностей ДНК, которые могут находиться как в кодирующей части генома, так и в некодирующей.

## Материалы и методы

В данной работе произведен поиск полиморфных RAPD-фрагментов для разных популяций камчатской микижи и конструирование на их основе SCAR- маркеров.

Материал был собран от разных форм *Parasalmo (O.) mykiss*, обитающих в наиболее крупных реках и водных бассейнах Камчатки, близ Шантарских островов, а также американских популяций. Всего было исследовано 7 популяций *O. mykiss*, в качестве репера были использованы образцы североамериканской микижи: steelhead and inland формы).

Тотальную ДНК выделяли из замороженной мышечной ткани стандартным методом, включающим гомогенизацию материала с буфером Net 25 (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5-8, 25 mM EDTA), лизис клеток 3%-ным саркозилем Na, инкубацию лизата с протеиназой K (100 mg/ml) в течении 3 часов при 60°C и депротеинизацию смесью фенол-хлороформ (1:1) и хлороформ-изоамиловый спирт (24:1).

Реакцию амплификации для определения RAPD-маркеров проводили по стандартному протоколу и стандартной программе [2]. Полиморфные фрагменты вырезали из геля, выделяли ДНК.

Элюированный RAPD-фрагмент лигировали с pGEM-T-вектором набора для клонирования pGEM-T vector system II («Promega»). Все операции проводили по протоколу фирмы «Promega». После трансформации из рекомбинантных клонов выделяли плазмидную ДНК, проверяли на наличие клонированных RAPD-фрагментов и секвенировали. К полученным последовательностям подбирали SCAR-праймеры, имеющие длину 24-30bp, и обычно, включающие в себя всю или часть последовательности RAPD- праймера. Амплификацию проводили еще раз.

## Результаты и обсуждение

Нами был получен полиморфизм по семи парам сконструированных SCAR-праймеров, при амплификации других фрагментов полиморфизма получить не удалось.

Таблица

SCAR-праймеры и условия ПЦР-реакции для амплификации SCAR-маркеров камчатской микижи.

Номер фрагмента, размер полученного SCAR-продукта	Праймеры на фрагмент (SCAR-праймеры)	Температура отжига °C
(470bp)		
1	Ccgggcacctacaggctgaattcg Tagtagagtagtgcctgagggca	65
(358bp)		
2	Tgatgtcacctgtcccctaatg Cactgcactctgggaagcctaact	65
(155 bp)		
3	Gcctctttgcgaacattgtaaacctcc Gcaatactagtgtttaagctacttttgaa	65
4 (617 bp)	Ccctagtctttgtggtgaaactg Actggagtggagcaaatgtagcg	68
5 (483 bp)	Ctggaggctaaggagacgagagga Ttcttagtggctcagtgtgggtca	71
6 (383 bp)	Gtgtatttccatctcccctcttg Ttctttgtgggttcgactatagcg	65
7 (293 bp)	Aacgagcttccatgccatacaaca	

	Gtttggcagcatgagtgaaggagg	
--	--------------------------	--

Исчезновение полиморфизма при создании SCAR-маркеров было не раз отмечено в литературе. Оно обычно происходит в тех случаях, когда исходный полиморфизм был вызван точковой мутацией в сайте отжига праймера, и объясняется тем, что единичная замена основания в сайте отжига предотвращает туда посадку более короткого RAPD-праймера, но не препятствует отжигу более длинного SCAR-праймера, удерживаемого большим числом связей. Кроме того, в случае использования SCAR-праймеров сайт точковой мутации, лежащий в основе исходного RAPD-полиморфизма, смещается в середину SCAR-праймера, и как правило, не влияет на эффективность и специфичность амплификации.

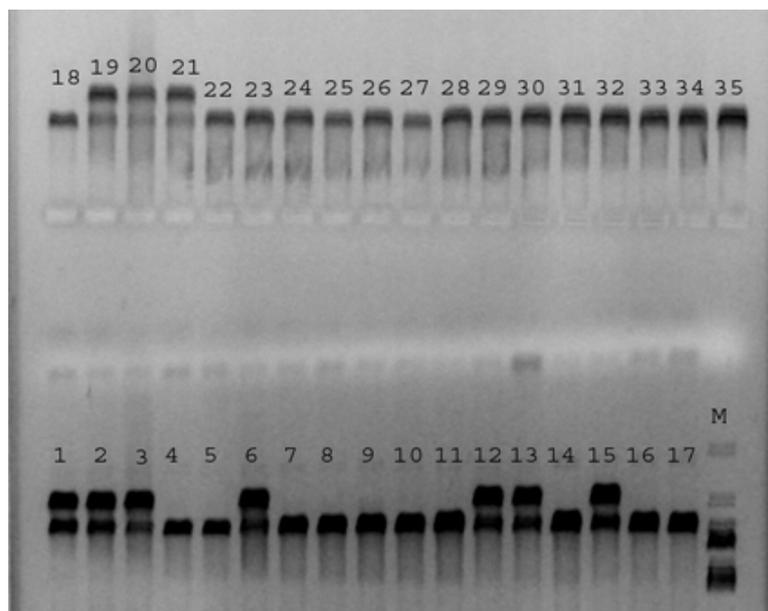
Из хорошо известных методов восстановления полиморфизма (оптимизация параметров ПЦР, рестрикция полученных фрагментов, подбор новых, иногда вырожденных праймеров, использование генетически отдаленных видов и т.д.) нами было использовано только повышение температуры отжига праймера.

При использовании, вышеуказанных SCAR-праймеров, в наших исследованиях амплифицировался единственный фрагмент по размеру чуть меньше исходного полиморфного RAPD-фрагмента. Для проверки полученных экспериментальных данных мы выборочно секвенировали несколько полученных SCAR-маркеров. Их последовательность полностью совпала с соответствующим RAPD-продуктом.

При проверке выделенных последовательностей, имеющих полиморфизм, по Gene-банку выяснилось, что только одна из последовательностей (SCAR-маркер 155 bp) имеет около 32% сходства (64 нуклеотида из 200 возможных – 82-86% идентичности) со структурными генами *Salmo salar* (*caspase 3B gene*, *pparb2B gene for peroxisome proliferator-activated receptor beta2B*, exon 5), *Oncorhynchus mykiss SYPG1 gene*. Другой SCAR-маркер (617 bp) имел фрагмент в 108 bp (14,4%) на 87 % идентичный *Oncorhynchus mykiss SYPG1 gene*. Остальные последовательности имели очень малый процент сходства с последовательностями, имеющимися в Gene-банке. Так, фрагмент SCAR-маркера (358 bp) в 32 нуклеотида был на 94% идентичен интрону d гормонов роста I и II разных видов *Coregonus*, а SCAR-маркер (514 bp) только очень маленькими фрагментами в 20-23 нуклеотида был идентичен последовательностям из полных геномов *Zebrafish* и *Homo sapiens*. SCAR-маркер (470 bp) имел сходство с имеющимся в Gene-банке микросателлитным CA-повтором *S.salar* и 16-28 S RNA бактерий. SCAR-маркер (483 bp) имел небольшие фрагменты (около 30 bp) сходные с разнообразными повторами человека, мышей и собак. SCAR-маркер (383 bp) имел фрагмент в 120 bp, схожий с микроглобулиновым геном *O.mykiss*.

Таким образом, по всей вероятности мы получили фрагменты некодирующих и потому накапливающих мутации повторяющихся последовательностей ДНК. Количество этих повторов варьирует в популяциях Камчатской семги и может являться генетическим маркером при популяционном анализе данной группы организмов.

При анализе подобранных SCAR-маркеров на больших выборках камчатской микижи оказалось, что пять из них выявляют географический полиморфизм у данного вида организмов.



**Рис.** Полиморфный SCAR профиль: (1-21) микижа из реки Коль, (22-35) – микижа из реки Облуковина; маркер 1 kb ("SibEnzim")

#### Литература

1. Павлов С.Д., Колесников А.А., Мельникова М.Н., Ушакова М.В. Генетическая дивергенция камчатской микижи (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss*) на ареале по результатам рестрикционного анализа и секвенирования гена цитохрома b мтДНК. 2004. *Генетика*. 40, 12, 1695—1701
2. Мельникова М.Н., Гречко В.В., Медников Б.М. Исследование полиморфизма и дивергенции геномной ДНК на видовом и популяционном уровнях (на примере ДНК пород домашних овец и диких баранов). 1995. *Генетика*. 31, 8, 1120-1131.

#### Резюме

Проведенные ранее исследования, основанные на секвенировании гипервариабельных последовательностей митохондриальной ДНК, и рестрикции последовательностей гормонов роста показали выраженную монофилетичность камчатских популяций микижи и необходимость подбора специальных маркеров для этой группы организмов. В ходе экспериментов были подобраны 7 SCAR-маркеров, выявляющих географический полиморфизм популяций данного вида.

Проведені раніше дослідження, засновані на секвенуванні гіперваріабельних послідовностей мітохондріальною ДНК, і рестрикції послідовностей гормонів зростання показали виражену монофілетичність камчатських популяцій мікижі і необхідність підбору спеціальних маркерів для цієї групи організмів. В ході експериментів було підбрано 7 SCAR-маркерів, що виявляють географічний поліморфізм популяцій даного вигляду.

Carried out before the research, based on sequenced hypervariable sequences of mitochondrial DNA, and restriction sequences of growth hormones have shown expressed monophyletic the Kamchatka populations of mykizha and necessity selection of special markers for this group organisms. During experiments have been picked up 7 SCAR-markers revealing geographical polymorphism of populations for this species.