



УДК 639.3.043.2

Е.Г. БОЙКО, Я.А. КАПУСТИНА, кандидаты биологических наук*Государственный научно-производственный центр рыбного хозяйства
Тюменская государственная сельскохозяйственная академия***ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ГАЛОФИЛЬНОГО РАЧКА *ARTEMIA* КАК НАИБОЛЕЕ
ПЕРСПЕКТИВНОГО ЖИВОГО КОРМА ДЛЯ РЫБ**

Изучены 6 белковых систем ряда популяций артемии. Выявлены 22 зоны активности. Получены последовательности участка гена цитохромоксидазы I мтДНК различных образцов артемии, включающих как идентифицированные виды, так и популяции с неустановленным видовым статусом. На основании изучения биохимических спектров белков и участков COI мтДНК получены результаты, демонстрирующие филогенетические отношения различных популяций артемии.

Одной из наиболее важных биотехнических проблем при искусственном разведении рыб является обеспечение их питанием на ранних стадиях развития. Искусственное разведение ценных пород рыб невозможно без применения полноценных кормов. В настоящее время не существует искусственного корма, который обеспечил бы максимальный рост личинок рыб на начальной стадии постэмбрионального развития. В связи с этим более выгодным представляется использование живых кормов, содержащих целый комплекс аминокислот, витаминов, микроэлементов и других жизненно необходимых веществ. Наиболее перспективен жаброногий рачок *Artemia* – обитатель соленых водоемов, обладающий высокими кормовыми качествами. Растущий спрос на цисты артемии на мировом рынке определил новый этап в развитии аквакультуры.

Род *Artemia* включает комплекс бисексуальных и партеногенетических морфологически сходных видов, дивергировавших от исходной формы 5,5 млн лет назад на Средиземноморье [1]. Рачок *Artemia* обитает в гиперсоленых водоемах по всему миру, за исключением Антарктики [2]. В настоящее время идентифицировано 7 бисексуальных видов (*Artemia franciscana* с двумя подвидами, *Artemia salina* (синоним *Artemia tunisiana*), *A. tibetiana*, *A. sinica*, *A. urmiana*, *A. persimilis*, *A. sp.*) и несколько партеногенетических типов, которые обнаружены только в водоемах Евразии, Африки и Австралии [2].

Обширный ареал артемии в России практически не исследован. В настоящее время проблема популяционной дифференциации рода *Artemia* решается с помощью целого арсенала методов и приемов, само многообразие которых свидетельствует о важности данной проблемы как с точки зрения фундаментальной, так и прикладной науки.

Определение видовой принадлежности артемии соленых озер России является не только актуальным, но и необходимым. Цель настоящей

работы заключается в сравнительном анализе генетических данных, полученных разными методами генетической идентификации различных образцов артемии.

Работа выполнена в центре Молекулярно-генетической идентификации Научного органа СИТЕС (ВНИРО, г. Москва) под руководством В.А. Барминцева и А.А. Волкова и в лаборатории промысловых беспозвоночных ФГУП “Госрыбцентр”. Цисты зарубежных популяций предоставлены Бельгийским артемиевым реферативным центром.

Белковый экстракт получали из половозрелой артемии. Электрофоретическое разделение белков проводили в 7,5%-м полиакриламидном геле при силе тока 140 мА в течение 3,5 ч при температуре 4–6 °С. Растворы и буферные смеси готовили по прописям Маурера [3]. Гелевые блоки окрашивали гистохимически на общий белок, неспецифические эстеразы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, карбоангидразу, изоцитратдегидрогеназу, глюкозофосфатизомеразу [4].

ДНК-анализу подвергнуты 14 образцов артемии из различных озер России, Монголии, Казахстана и Туркменистана с неустановленным видовым статусом, а также *A. urmiana* (Иран), *A. tibetiana* (Китай), *A. sinica* (Китай), *A. salina* (Египет), *A. persimilis* (Аргентина). Образец *A. franciscana* Kellogg 1906 взят из Genebank NC_001620. Анализ белкового полиморфизма провели в 13 популяциях артемии из России, Монголии и Китая.

ДНК выделяли из свежевыклюнувшихся науплий в лизирующем буфере. После полного лизиса ткани проводили очистку ДНК [5]. Полимеразную цепную реакцию выполняли по следующей схеме: первичная денатурация: 95 °С – 1 мин 45 с однократно; 50 рабочих циклов: 95 °С – 1 мин 30 с, 48 °С – 1 мин 30 с, 72 °С – 2 мин; достройка: 72 °С – 5 мин 30 с однократно. Секвенирование в обоих направлениях проводили на капиллярном анализаторе ABI Prizm 3100 с использованием набора BigDye v. 1.1.

При изучении 6 белковых систем выявлены 22 зоны активности: 11 локусов общего белка, по 3 локуса в спектре неспецифических эстераз, карбоангидразы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и по 1 мономорфному локусу в спектре изоцитратдегидрогеназы и глюкозофосфатизомеразы.

Наибольшее сходство обнаружено между популяциями артемии из озер Актобан и Б. Курейное (индекс сходства 0,998) [6]. Очень высокий уровень сходства выявлен между популяциями рачка из озер Актобан и Вишняковское, Б. Курейное и Вишняковское (индекс сходства равен 0,973). Уровень сходства остальных популяций оказался ниже 95 %. Самый низкий индекс генетического подобия выявлен между *A. sinica* и популяцией артемии из оз. Кулундинское (индекс сходства 0,168). На дендрограмме генетического сходства (рис. 1) видно, что все 13 исследованных озер распределились в 4 кластера. Первый образован популяциями артемии из озер Актобан, Курейное, Вишняковское и Чердынское, второй – из озер Ульжай, Невидим, Б. Яровое, Окунево и Б. Медвежье. Популяция рачка из оз. Эбейты кластеризовалась с *A. sinica*. Озера Кулундинское и Баян-Тухум образовали общий кластер.

В настоящее время наряду с изучением белкового полиморфизма в популяционно-генетических исследованиях широко применяют анализ изменчивости ядерной и митохондриальной ДНК.

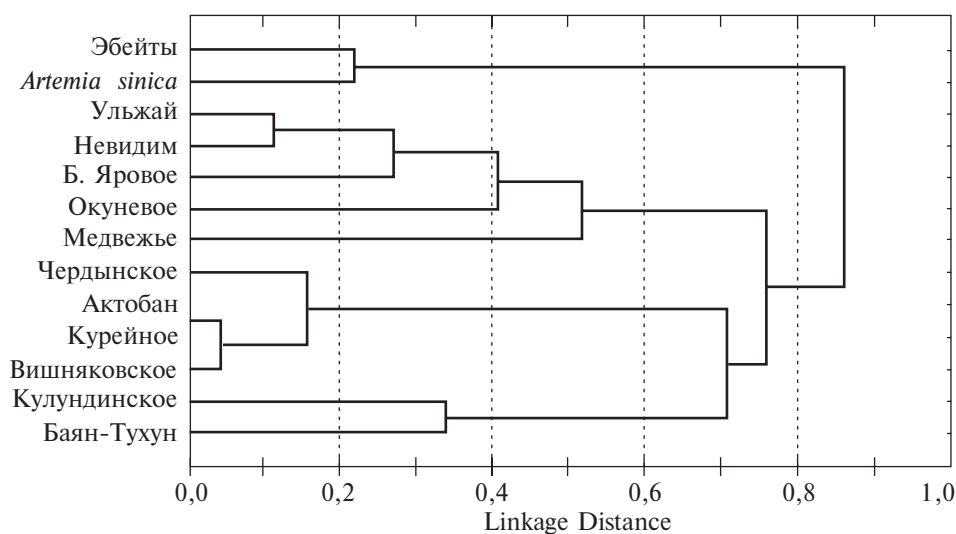


Рис. 1. Дендрограмма генетического сходства артемии, построенная на основе данных биохимического анализа

Для выяснения филогенетических отношений рачка *Artemia* нами получены последовательности участка гена цитохромоксидазы I (COI) митохондриальной ДНК ряда популяций артемии из разных мест обитания, включающих как идентифицированные виды, так и популяции с неустановленным видовым статусом.

На основании изучения COI участков мтДНК получены результаты, демонстрирующие филогенетические отношения различных популяций артемии. Дивергенция по гену COI представлена на рис. 2.

При объединении изученных образцов артемии образуются пять кластеров. Кластеризация популяций артемии в первую очередь обусловлена территориальным фактором, следствием которого является репродуктивная изоляция, которая достигается благодаря наличию географических или физических барьеров [1]. Азиатские популяции рачка распределились в три кластера, один из которых образован партеногенетическими популяциями из России, Казахстана и Туркменистана. Эти популяции часто классифицируют как *A. parthenogenetica* [7]. Второй кластер образован бисексуальными популяциями из Монголии (оз. Баян-Тухум), России (оз. Сватиково) и Китая (*A. sinica*). В третий кластер попала артемия с бисексуальным типом размножения из Китая (*A. tibetiana*), Ирана (*A. urmiana*) и России (оз. Танатар). Два оставшихся кластера образованы популяциями артемии из Африки (Египет) и Южной Америки (Аргентина). Помимо географического фактора на формирование филогенетических отношений, выраженных в виде дендрограммы генетического сходства, влияют также биологические особенности объекта, а именно тип размножения (бисексуальный или партеногенетический).

Сравнение двух дендрограмм сходства показало несоответствие полученных результатов. На дендрограмме, основанной на анализе COI мтДНК, популяции артемии из озер Баян-Тухум и *A. sinica* кластеризовались на

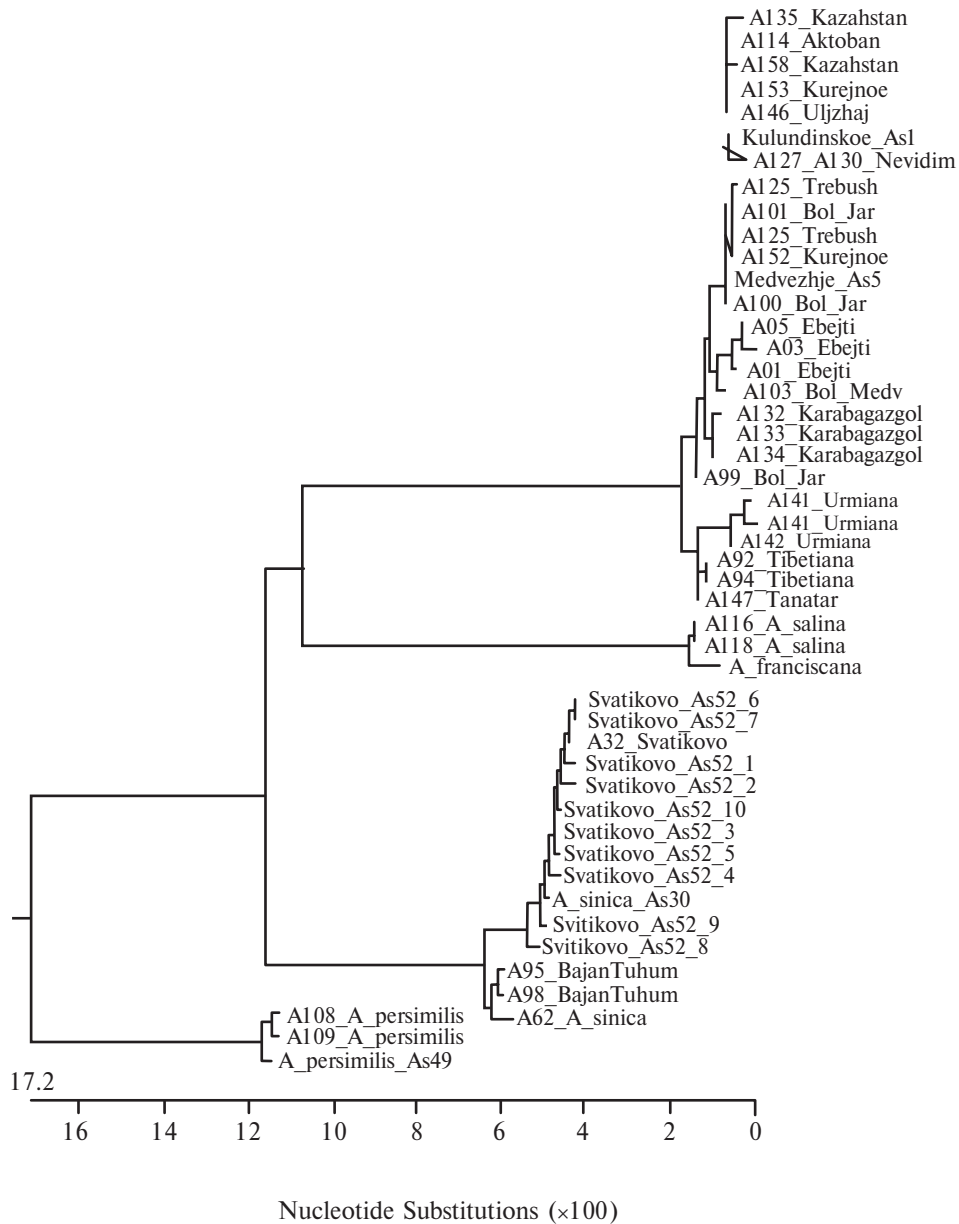


Рис. 2. Филогенетическое древо изученных популяций артемии, основанное на анализе COI мтДНК

высоком уровне генетического сходства. В то же время на дендрограмме сходства, основанной на данных по белковому полиморфизму, эти популяции кластеризовались на низком уровне генетического сходства. Все российские популяции артемии с партеногенетическим типом размножения образовали единый кластер при дифференциации по нуклеотидным заменам в структуре ДНК. Идентификация методом анализа маркеров генов (белков) выявила существование нескольких групп в пределах партеногенетических форм артемии. Если на основе данных по био-

химической генетике невозможно выделить дифференцирующий фактор, то в случае анализа ДНК четко прослеживается зависимость кластеризации различных популяций артемии от репродуктивной изоляции и типа размножения. На дендрограмме сходства, основанной на анализе COI мтДНК, все популяции с партеногенетическим типом размножения расположились в одном кластере, бисексуальные популяции разделились в 4 кластера согласно территориальному расположению озер.

Построение кластеров на основе данных по 6 белковым системам не выявило закономерностей в распределении изученных популяций артемии. Не обнаружена связь с воспроизводительной системой: партеногенетические и бисексуальные популяции рачка объединились в одних кластерах. Близко расположенные друг к другу водоемы оказались в разных кластерах и, наоборот, отдаленные – в одних.

Методы анализа ДНК, несомненно, обеспечивают получение гораздо более полной картины генетической изменчивости популяций, поскольку нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, составляют лишь небольшую часть генома, а методом электрофореза выявляется не более 30 % аминокислотных замещений в составе белковых молекул [8]. Во многих случаях анализ структуры ДНК позволяет обнаружить межвидовые или межпопуляционные генетические различия, не распознаваемые методами электрофореза белков [9]. Принимая во внимание данные по идентификации различных популяций артемии, полученные на основе методов молекулярно-генетического и биохимического анализов, можно сделать вывод о несоответствии полученных результатов. Вместе с тем следует отметить, что анализируемые методики не являются взаимоисключающими, а дополняющими друг друга. Цели обоих методов – определение степени генетического сходства. Методы биохимической генетики направлены в основном на изучение генетической изменчивости отдельных популяций, в то время как методы анализа ДНК позволяют идентифицировать текущее состояние популяций и тем самым позволяют решать вопросы таксономии и филогенетических взаимоотношений между различными локальностями артемии.

Таким образом, на основании сравнительного анализа полученных результатов можно констатировать, что изучение COI мтДНК является более приемлемым для видовой идентификации рачка *Artemia*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. **Gajardo G.** Evolution and speciation. *Artemia: basic and applied biology* / G. Gajardo, T.J. Abatzopoulos, I. Kappas, J.A. Beardmore. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. – P. 225–250.
2. **Van Stappen G.** Zoogeography. *Artemia: basic and applied biology* / G. van Stappen – Kluwer Academic Publishers, 2002. – P. 171–224.
3. **Зиновьева Н.А.** Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных / Зиновьева Н.А., Е.А. Гладырь, Л.К. Эрнст, Г. Брем. – М., 2002. – 112 с.
4. **Маурер Г.** Диск-электрофорез / Г. Маурер. – М.: Мир, 1971. – 212 с.
5. **Корочкин Л.И.** Генетика изоферментов / Л.И. Корочкин, О.Л. Серов, А.И. Пудовкин и др. – М.: Наука, 1977. – 275 с.
6. **Ней М.** Генетическое расстояние и молекулярная таксономия / М. Ней. – М.: Наука, 1981. – С. 7–18.
7. **Sorgeloos P.** Manual for the culture and use of brine shrimp in aquaculture / P. Sorgeloos P. Lavens, Ph. Leger et al. – Belgium, Ghent., 1986. – 319 p.

8. **Hallerman E.M.** DNA-level polymorphism as a tool in fisheries science / E.M. Hallerman, J.S. Beckman // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 1988. – Vol. 45. – P. 1075–1087.
9. **Smith P.** Allozyme and microsatellite DNA markers of toothfish population structure in the Southern Ocean / P. Smith, M. J. McVeagh // *Fish Biol.* – 2000. – Vol. 57. – P. 72–83.

Поступила в редакцию 27.12.06

E.G. BOYKO, YA.A. KAPUSTINA

POPULATION-GENETIC STUDIES OF *ARTEMIA* AS THE MOST PROMISING LIVING FEED FOR FISH

Six protein systems of some *Artemia* populations were studied. Twenty two zones of activity were founded. Nucleotide sequences of COI mtDNA from the different *Artemia* samples were received. The samples included species and unidentified strains. The results demonstrated the relationships between the different samples of *Artemia*.

УДК 639.3.043.2

Л.И. ЛИТВИНЕНКО, кандидат биологических наук

*Государственный научно-производственный центр рыбного хозяйства
Тюменская государственная сельскохозяйственная академия*

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ НА РАЗВИТИЕ ЖАБРОНОГО РАЧКА АРТЕМИИ – ОСНОВНОГО ГАЛОБИОНТА СОЛЕННЫХ ОЗЕР

Проведены исследования по выявлению некоторых основных факторов, влияющих на развитие артемии в озерах. Показано определяющее влияние солености на плотность ее популяции.

Науплиусы, получаемые при инкубации из цист жаброногого рачка *Artemia*, во всем мире признаны одним из лучших живых стартовых кормов для многих видов рыб и ракообразных. За последние 10 лет в озерах Западной Сибири ежегодно заготавливали от 85 до 1118 т цист. В последние 3 года промысел цист стабилизировался в пределах 820–970 т. Стремительное развитие аквакультуры стало причиной роста антропогенного пресса на запасы цист. В этих условиях актуальным является сохранение численности популяций артемии. Для решения этой задачи проведены исследования по влиянию некоторых факторов на развитие артемии в озерах. Анализ проводили по среднесезонным данным (1995–2004 гг.) по 30 популяциям.

Амплитуда колебаний исследованных параметров в озерах была следующей: соленость воды 41–222 г/л, рН 7,6–9,1, содержание хлоридов 20–96 г/л, содержание сульфатов 3–57 г/л, отношение ионов Cl^-/SO_4^{2-} 0,7–26,3; биомасса зоопланктона 0–8,3 мг/л, число видов зоопланктона 1–4, биомасса фитопланктона 0,02–6,0 мг/л, биомасса рачков артемии 1,2–61,3 мг/л, численность рачков артемии 2,4–