



УДК 639.3.043.2

Е.Г. БОЙКО, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
А.А. ВОЛКОВ*, научный сотрудник

Государственный научно-производственный центр рыбного хозяйства,
*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии
e-mail: egboyko@yandex.ru

БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В АКВАКУЛЬТУРЕ ГИПЕРГАЛИННОГО РАЧКА *ARTEMIA*

При использовании методики RAPD-PCR выявлено сходство между исследованными популяциями рачка артемии из России и некоторых сопредельных государств. Выделена аутгруппа, включающая *A. salina* (*A. tunisiana*), *A. franciscana* и *A. persimilis*.

Ключевые слова: рачок артемия, аквакультура, биоразнообразие, популяции, ДНК, метод RAPD-PCR.

Рачок *Artemia* обитает в гиперсоленых водоемах по всему миру, кроме Антарктики [1–3]. В пределах России и сопредельных государств артемия обнаружена в соленых водоемах Западной и Восточной Сибири, Каспийского и Черноморского бассейнов.

Способность рачков изменять внешний облик привела к большой путанице в систематике рода *Artemia*. Вследствие этого его классификация до сих пор не разработана. Ранее считалось, что существует только один вид – *Artemia salina*. Но эксперименты по скрещиванию обнаружили репродуктивную изоляцию некоторых географических рас [3]. В настоящее время идентифицировано 7 бисексуальных видов: *A. salina* Linnaeus 1758 (водоемы Англии и Средиземноморья), в последнее время более широко используется видовое название *A. tunisiana* Bowen and Sterling 1978 (водоемы Северной Африки); *A. urmiana* Gunther 1900 (водоемы Ирана); *A. sinica* Yaneng 1989 (водоемы Центральной и Восточной Азии); *A. persimilis* Picinelli and Prosdocimi 1968 (водоемы Аргентины); *A. franciscana* – вид с 2 подвидами: *A. franciscana franciscana* Kellog 1906 (водоемы Америки, Карибских и Тихоокеанских островов) и *A. franciscana monica* Verrill 1869 (озеро Моно в США, водоемы Калифорнии); *A. species* Pilla and Beardmore 1994 (водоемы Казахстана); *A. tibetiana* Abatropoulos, Zhang and Sorgeloos 1998 (водоемы Тибета).

В водоемах Евразии, Африки и Австралии обнаружены партеногенетические формы артемии. Видовая принадлежность российских популяций артемии до сих пор не определена. В настоящее время проблема популяционной дифференциации рода *Artemia* решается с помощью разных методов (морфометрический, цитогенетический, биохимический, молекулярно-генетический и др.), многообразие которых свидетельствует о важности проблемы классификации различных локальностей рачка с точки зрения как фундаментальной, так и прикладной науки [4–6].

Появление так называемых «форм» артемии обусловлено результатом комплексного влияния условий окружающей среды на популяции рачка либо генотипической конституцией. Вероятно, существование различных «форм» артемии в первую очередь является ответом на физический эффект среды.

Генотип популяции и его фенотипическое проявление в силу исторически формирующихся связей взаимно отражают друг друга. Однако взаимодействие генов, связь признаков в развитии и паратипическая изменчивость лишают их соответствие однозначности. Это и превращает идентификацию генотипа по фенотипу в специальную проблему сохранения биоразнообразия артемии. Основная задача анализа состоит в идентификации различных локальностей рачка.

Некоторые особенности биологии артемии (быстрый рост, высокая плодовитость, способность продуцировать цисты) определили широкое использование артемии в аквакультуре. Цисты, продуцируемые рачком, можно легко заготавливать и транспортировать, а при необходимости — культивировать и получать науплии. Науплии артемии являются наиболее питательным кормом для личинок рыб и ракообразных. Калорийность науплий довольно высока — 5,8 ккал на 1 г сухого вещества.

Значительный коммерческий интерес к артемии в качестве живого корма для рыб и ракообразных, а также большой объем имеющейся научной информации по биологии рачка обуславливают необходимость проведения более масштабных исследований в данной области и в плане определения видовой принадлежности артемии соленых озер России, Казахстана, Туркменистана и Монголии.

Цель настоящих исследований — установить родственные связи между различными локальностями рачка *Artemia* в пределах России и ряда сопредельных государств методом RAPD-PCR.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в центре Молекулярно-генетической идентификации Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (г. Москва) под руководством В.А. Барминцева.

Нами предпринята попытка применить один из методов молекулярно-генетического анализа для выявления различий между популяциями артемии из различных мест обитания. Анализу подвергнута артемия из 13 озер юга Западной Сибири: Воскресенское, Собачье, Большое Медвежье, Требушинное, Невидим, Актобан и Большое Курейное Курганской области, Окуневое Челябинской области, Кулундинское, Танатар и Большое Яровое Алтайского края, а также Ульжай и Эбейты Омской области. Кроме того, в настоящий анализ вовлечены идентифицированные виды артемии: *A. sinica* (Китай), *A. persimilis* (Аргентина), *A. franciscana* (Канада, США), *A. tunisiana* (Египет), *A. urmiana* (Иран), *A. tibetiana* (Китай), а также неидентифицированные популяции артемии из Монголии, Китая, Казахстана и Туркменистана. Материалом для исследований послужили цисты артемии, собранные в естественных соляных водоемах.

Цисты зарубежных популяций предоставлены Артемиевым реферативным центром (Бельгия).

Для выделения ДНК использовали 20 мг цист, которые переносили в чистую пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 300–400 мкл лизирующего буфера. Далее инкубировали при 60 °С в течение 2–3 ч с периодическим встряхиванием. После полного лизиса ткани проводили очистку ДНК методом фенол-хлороформной экстракции.

Для определения степени фрагментации ДНК от образцов стокового раствора ДНК отбирали аликвоту в количестве 10 мкл и наносили на 0,5%-й агарозный гель, содержащий бромистый этидий. ДНК образца считалась пригодной для дальнейшего анализа, если фракция фрагментов ДНК размером 10–20 пар нуклеотидов (п.н.) и более составляет как минимум 20 % от общего количества выделенной ДНК. После нормализации концентрации ДНК исследуемых образцов проводили анализ полиморфизма ДНК с помощью постановки полимеразной цепной реакции (PCR) с использованием случайных праймеров. Реакцию осуществляли в стерильных условиях в ламинарном потоковом боксе САТ V3-1300. Сначала собирали общую смесь – «премикс» в одной пробирке, затем ее вносили в реакционные пробирки в объеме 20 мкл и добавляли 5 мкл нормализованной до концентрации 1 нг/мкл матричной ДНК. Для PCR использовали стандартные наборы реактивов (Диалат ЛТД). В данной работе для выполнения RAPD-PCR применяли праймер А-01. Реакцию проводили на термоциклере PTC-225 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) по программе: первичная денатурация: 94 °С – 5 мин однократно; 36 рабочих циклов: 94 °С – 30 с, 36 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин; достройка: 72 °С – 10 мин однократно. После окончания амплификации к пробам добавляли 5 мкл буфера для нанесения проб, содержащего 0,25 % бромфенолового синего, 0,25 % ксиленианола и 30 % глицерина, и проводили электрофорез в 6%-м полиакриламидном геле с однократным ЭДТА-трисборатным буфером. Электрофорез осуществлен при силе тока 75 мА/ч в течение 2,5 ч с помощью камеры для вертикального электрофореза белков и нуклеиновых кислот VE-3M (ООО «Хеликон»). После завершения электрофореза гель окрашивали в водном растворе бромистого этидия в течение 30 мин. Регистрацию электрофореграмм проводили на компьютере с помощью программы записи изображения Typhoon Scanner Control (Molecular Dynamics) и сканера гелей Typhoon8600 (Molecular Dynamics). RAPD-спектры ДНК исследуемых образцов артемии проанализировали с помощью программного обеспечения Phoretix 1D Advanced (Nonlinear Dynamics).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Специфическая амплификация ДНК применима только в том случае, если известна, хотя бы частично, последовательность ДНК исследуемого объекта. В противном случае выгодно использовать методику, основанную на случайной амплификации геномной ДНК или RAPD (полиморфизм фрагментов ДНК, амплифицированных с помощью произвольных праймеров).

Главное преимущество RAPD состоит в том, что для его применения не требуется предварительного знания о последовательности ДНК. Амплификация в RAPD осуществляется с участием коротких праймеров (10–20 п.н.) с произвольно выбранными последовательностями [7], что позволяет синтезировать в каждой реакции до нескольких десятков фрагментов ДНК. Локализация амплифицированных последовательностей в геноме неизвестна, однако полученный набор фрагментов (полос на электрофореze) характерен для каждого исследуемого образца. Число и размер амплифицированных фрагментов зависят от длины и последовательности используемого праймера. Участки связывания праймеров распределяются по геному случайно, полиморфизм в таких сайтах выражается в наличии или отсутствии соответствующих фрагментов на электрофореze [8].

Амплификация тотальной ДНК исследованных образцов артемии позволила выявить спектр фрагментов, представляющих собой некодирующие последовательности с различной степенью вариабельности и присутствующие в разных областях генома. Таким образом, RAPD-PCR генерировал спектр фрагментов, как мономорфных, так и полиморфных, имеющих различную частоту встречаемости среди популяций артемии.

Электрофореграммы RAPD-спектров амплификатов тотальной ДНК исследованных образцов артемии приведены на рис. 1–3.

RAPD-PCR тотальной ДНК артемии позволил выделить для статистической оценки полиморфные фрагменты у представителей, принадлежащих различным популяциям артемии. Данный анализ основывался на выявлении различий между популяциями, а не на поиске мономорфных генетических маркеров, присущих представителям той или иной популяции.

Выявлено четкое разграничение между исследованными популяциями артемии. Это проявилось не только в размере, но и в числе амплифицированных фрагментов. Артемия российских озер характеризовалась наличием двух наиболее интенсивных фракций с числом

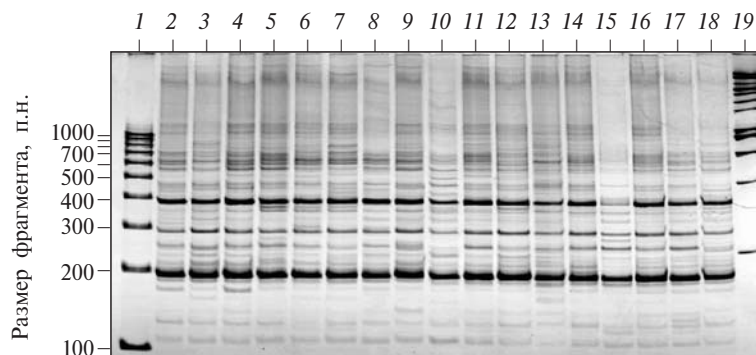


Рис. 1. Электрофореграмма RAPD-профилей суммарной ДНК артемии с использованием праймера А-01:

на дорожках: 1 – размерный стандарт – ладдер (100 п.н.); 2–4 – оз. Кулундинское; 5–7 – оз. Большое Медвежье; 8–10 – оз. Эбейты; 11, 12 – оз. Большое Яровое; 13 – оз. Актобан; 14, 15 – оз. Невидим; 16, 17 – оз. Большое Курейное; 18 – оз. Ульжай; 19 – размерный стандарт-ладдер (10 п.н.)

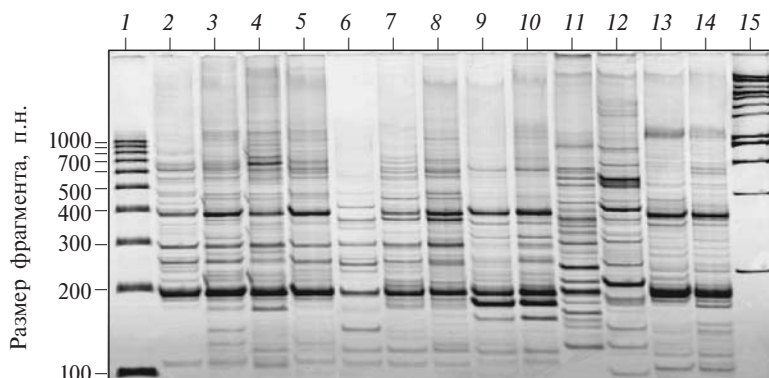


Рис. 2. Электрофореграмма RAPD-профилей суммарной ДНК артемии с использованием праймера А-01:

на дорожках: 1 – размерный стандарт-ладдер (100 п.н.); 2 – оз. Окуневое; 3 – оз. Собачье; 4 – оз. Воскресенское; 5 – оз. Требушинное; 6–8 – *A. urmiana*; 9, 10 – *A. tibetiana*; 11 – *A. tunisiana*; 12 – *A. franciscana* SFB; 13, 14 – *A. sinica*; 15 – размерный стандарт-ладдер (10 п.н.)

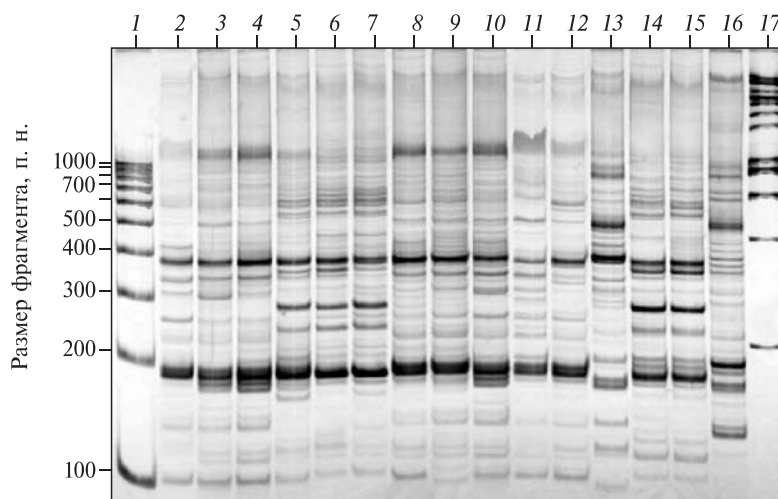


Рис. 3. Электрофореграмма RAPD-профилей суммарной ДНК артемии с использованием праймера А-01:

на дорожках: 1 – размерный стандарт-ладдер (100 п.н.); 2 – *A. sinica*; 3, 4 – *A. sp.* Yimeng; 5 – оз. Теке (Казахстан); 6, 7 – неизвестное озеро (Казахстан); 8, 9 – оз. Баян-Тухум (Монголия); 10 – оз. Уайдам (Монголия); 11 – оз. Ихцайдам (Монголия); 12 – озеро Тухум (Монголия); 13 – *A. tunisiana*; 14, 15 – зал. Карабагаз-Гол; 16 – *A. franciscana* Lake Ingerbright North (Canada); 17 – размерный стандарт-ладдер (10 п.н.)

пар нуклеотидов 400 и 200. На электрофореграммах проявились также менее сильные бэнды, число которых варьировало. Из них выделялись фракции, соответствующие размерам 300 и 260 п.н. Именно эти четыре основных амплификата использованы для сравнительного анализа.

Подобная закономерность прослеживалась в группе популяций из Монголии, Китая, Туркменистана и Казахстана, а также у *A. sinica*, *A. urmiana*, *A. tibetiana*. Их RAPD-спектр напоминал спектр амплификатов российских популяций. Это проявилось главным образом в

присутствии у всех указанных образцов амплификатов размерами 400 и 300 п.н. У *A. urmiana*, *A. tibetiana* и *A. sinica* обнаружены дополнительные полосы, не характерные для российских популяций артемии. Так, у *A. urmiana* наблюдался бэнд размером чуть менее 400 п.н. У *A. tibetiana* имелась дополнительная полоса, соответствующая 180 п.н. RAPD-спектр *A. sinica* отличался менее обозначенными фрагментами в средней части рисунка. Таким образом, отмечено значительное сходство профилей исследованных популяций Азиатского континента. Из общего ряда выделялись *A. tunisiana*, *A. franciscana* и *A. persimilis*. Для них характерно число амплификатов, отличное от остальных исследованных образцов рачка.

На основании анализа частоты встречаемости выбранных нами фрагментов с помощью пакета статистических программ Statistica Cluster Analysis построена дендрограмма генетического сходства невзвешенным парно-групповым способом (UPGMA) с коэффициентом дистанции по Дайсу (рис. 4).

При оценке генетических дистанций между различными популяциями артемии выявлены определенные закономерности.

Анализ объединения изученных образцов артемии в дендрограмме сходства, позволил выделить три неравнозначных кластера. Самый большой кластер составили популяции артемии из России, Казахстана и Туркменистана, к которым примыкают *A. tibetiana* и *A. urmiana*, а также партеногенетическая популяция рачка из Монголии. Второй кластер состоит из двух подкластеров: первый образован популяциями артемии из Монголии и Китая, второй объединил два образца *A. franciscana* из Канады и США. В аутгруппу выделились *A. persimilis* (Аргентина), *A. tunisiana* (Тунис) и *A. salina* (*A. tunisiana*) (Египет).

Проведенный RAPD тотальной ДНК различных образцов артемии показал наличие филогенетической близости популяций Азиатского континента. *A. tunisiana* (*A. salina*), *A. persimilis* и *A. franciscana* являются достаточно обособленными видами.

На основании полученных фореграмм RAPD-спектров амплификатов тотальной ДНК исследованных образцов артемии можно констатировать, что все исследованные партеногенетические популяции артемии озер юга Западной Сибири относятся к одной группе с неустановленным видовым статусом. Полученные закономерности обусловлены биологическими особенностями объекта, в частности типом размножения (бисексуальный или партеногенетический).

Метод построения кластеров, а также их интерпретация часто носят неоднозначный характер. Идентификация методом RAPD-PCR позволила прямым сравнением профилей установить родственность и дистантность различных популяций артемии. Несмотря на отсутствие четкой корреляции между характером распределения ДНК-фингерпринтов в дендрограмме и географическим расположением водоемов, существует тенденция к группированию популяций рачка согласно данному фактору.

Несмотря на явные преимущества генетических методов перед другими в изучении популяционной структуры вида, характер внутривидовой дифференциации и филогенетические связи ряда сложно организованных объектов остаются не до конца выясненными. Причин

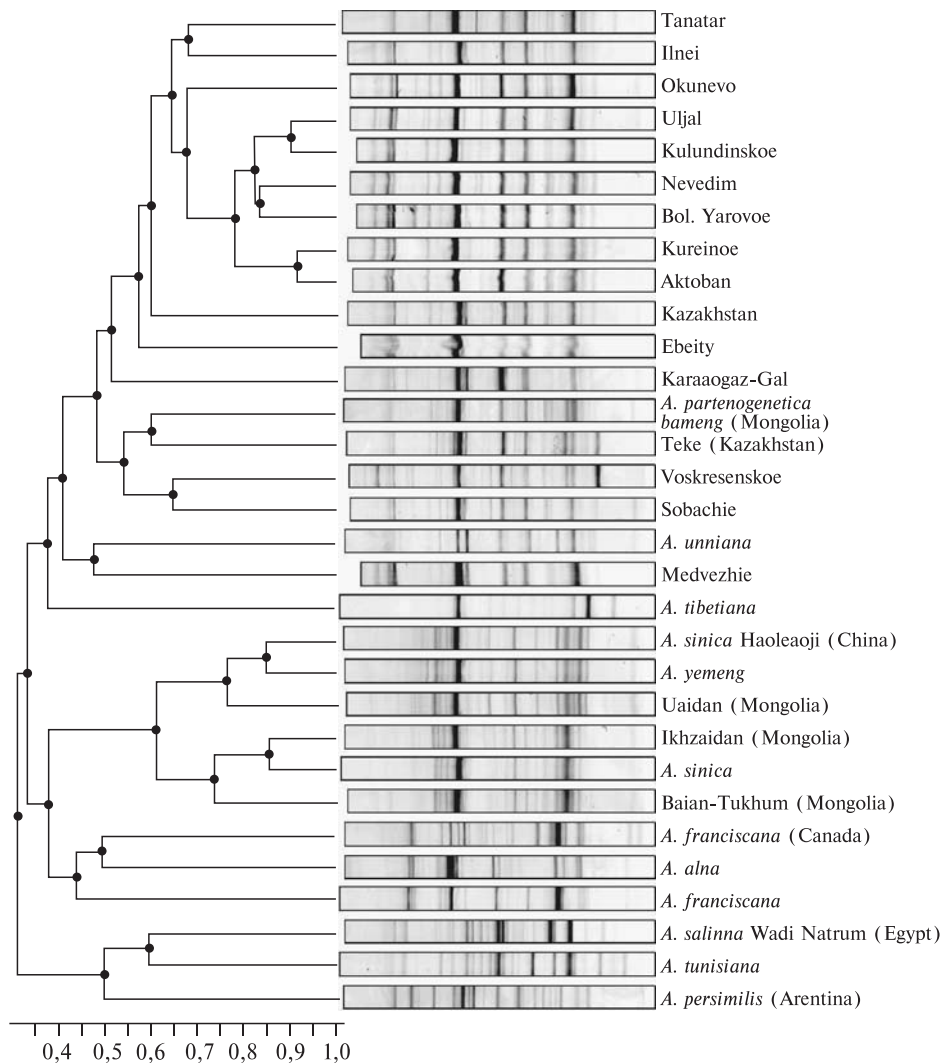


Рис. 4. Дендрограмма генетического сходства RAPD-профилей ДНК с использованием праймера А-01 анализируемых особей артемии

тому много, и не последней из них является отсутствие единой методической основы и несогласованность в интерпретации генетических данных различными исследователями. Конкретные примеры их использования в целях управления состоянием запасов и регулирования промысла исчисляются небольшим количеством. Таким образом, перед учеными встает задача создание единой методической основы для решения вопроса происхождения и дифференциации артемии. В этом отношении перспективным является построение филогенетической системы рода *Artemia* на основании RAPD-PCR тотальной ДНК. Из-за простоты и быстроты в выполнении процедура RAPD очень эффективна. На наш взгляд, данный метод является в настоящий момент одним из наиболее перспективных для популяционных исследований, однако нуждается в стандартизации для получения воспроизводимых результатов между различными лабораториями.

ВЫВОДЫ

1. RAPD-PCR анализ позволил установить степень дистантности исследованных популяций артемии путем прямого сравнения профилей.
2. Все исследованные образцы российских популяций артемии, в том числе бисексуальная популяция из оз. Танатар, принадлежат к одной группе рачков, с неустановленным видовым статусом.
3. Отмечено генетическое сходство образцов артемии России, Казахстана, Туркменистана и Монголии, а также к *A. urmiana* и *A. tibetiana*.
4. Несмотря на отсутствие четкой корреляции между характером распределения ДНК-фингерпринтов в дендрограмме и географическим расположением водоемов, а также принадлежности к определенному виду, существует тенденция к группированию особей согласно географическому фактору. Это указывает на необходимость более масштабного детального анализа, при котором высока вероятность нахождения маркера или группы маркеров, связанных с наличием того или иного качества, которое непосредственно или опосредовано проявляется у каждой отдельной группы артемии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Triantaphyllidis G.V., Abatzopoulos T.J., Sorgeloos P. Review of the biogeography of the genus Artemia (Crustacea, Anostraca) // J. Biogeography. – 1998. – Vol. 25. – P. 213–226.
2. Van Stappen G., Abatzopoulos Th.J., Beardmore J.A. et al. Zoogeography // Artemia: basic and applied biology. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. – P. 171–224.
3. Gajardo G., Crespo J., Triantafyllidis A. et al. Species identification of Chilean Artemia populations based on mitochondrial DNA RFLP analysis // J. Biogeography. – 2004. – Vol. 31. – P. 547–555.
4. Bossier P. Authentication of seafood products by DNA patterns // J. Food Science. – 1999. – Vol. 64, No 2. – P. 189–193.
5. Sun Y., Zhong Y., Song W. et al. Detection of genetic relationships among four Artemia species using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) // Intern. J. Salt Lake Research. – 1999. – Vol. 8. – P. 139–147.
6. Smith P., McVeagh M. Allozyme and microsatellite DNA markers of toothfish population structure in the Southern Ocean // J. Fish Biol. – 2000. – Vol. 57. – P. 72–83.
7. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова, О.Л. Курбатова и др. – М.: Наука, 2004. – 618 с.
8. Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers // Methods Enzymol. – 1993. – Vol. 218. – P. 704–740.

Поступила в редакцию 29.12.2008

E.G. BOYKO, A.A. VOLKOV

BIODIVERSITY AND APPLICATION
OF BRINE SHRIMP *ARTEMIA* IN AQUACULTURE

Using the RAPD-PCR methods, there was revealed the affinity between Artemia populations investigated in Russia and in some neighbouring states. *A. salina* (*A. tunisiana*), *A. franciscana*, and *A. persimilis* are united into an outgroup.

Keywords: brine shrimp Artemia, aquaculture, biodiversity, populations, DNA, RAPD-PCR method.