

На правах рукописи
УДК 577.212.8:597.554.3



003457789

ЛУДАННЫЙ РУСЛАН ИГОРЕВИЧ

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА КАРПОВЫХ (CYPRINIDAE)**

03.00.26 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

12 ДЕК 2008

Москва
2008

Работа выполнена в лаборатории организации генома Учреждения Российской академии наук Института биологии гена РАН.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Семенова Серафима Константиновна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Крамеров Дмитрий Александрович

кандидат биологических наук Зеленина Дарья Александровна

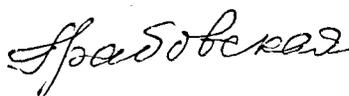
Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

Защита диссертации состоится «22» декабря 2008 года, в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН по адресу: 119334 Москва, ул. Вавилова д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991 Москва, ул. Вавилова д. 32.

Автореферат разослан « 21 » ноября 2008 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
канд. фарм. наук

 Л.С. Грабовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение структурной организации и вариабельности генома организмов различного таксономического ранга составляет одну из основных задач современной молекулярной генетики. Вопросы генетической изменчивости животных - объектов сельскохозяйственной деятельности человека – представляют особый интерес в связи с их не только фундаментальной, но и практической значимостью.

Карповые (Cyprinidae) представляют одну из наиболее важных и многочисленных промысловых групп пресноводных рыб. Они содержат более 2000 видов, принадлежащих к 210 родам, распространенных повсеместно, за исключением вод Антарктики и Южной Америки [<http://www.fishbase.org/>]. Наиболее популярным и излюбленным объектом прудового рыбоводства во многих странах мира является сазан *Cyprinus carpio* (подсемейство Cyprininae) и множество его одомашненных форм, часто называемых домашним карпом. В современной мировой аквакультуре домашний карп представлен большим числом пород, отводков и форм, различающихся по размеру, весу, окраске и чешуйчатому покрову. В течение последних десяти-пятнадцати лет интенсивно изучается генетическое и геномное разнообразие пород карпа зарубежной селекции с целью картирования генов продуктивности и устойчивости к различным заболеваниям, изменениям окружающей среды, а также для создания новых высокопродуктивных пород и линий [Orban and Wu, 2008]. С этой точки зрения молекулярно-генетическая изменчивость более двух десятков отечественных пород и линий карпа остается до сих пор неизученной.

Молекулярные маркеры могут служить эффективным инструментом при решении фундаментальных проблем, связанных с выяснением эволюционных механизмов возникновения геномной вариабельности. В этом отношении геном карповых рыб, как одной из наиболее молодых, относительно недавно возникших групп костистых рыб, представляет несомненный интерес. Однако до настоящего времени ведутся дискуссии относительно

центров происхождения, путей расселения и доместикиции дикого предка современного карпа [Берг, 1964; Balon, 1995; Kirpichnikov, 1999], а также относительно микро- и макроэволюционных процессов, приводящих к возникновению геномного и таксономического разнообразия у представителей всего семейства [Saitoh, 2006; Orban and Wu, 2006]. Следует отметить, что в этих исследованиях остается совершенно неохваченным российская часть современного ареала карповых. Кроме того, рыбы из этого семейства являются рекорсменами по числу случаев естественной межвидовой (межродовой) гибридизации [Schwartz, 1981]. Показано, что виды, вступающие в гибридизацию, принадлежат к нескольким древним филогенетическим линиям, к разным, исходно симпатричным родам и трибам (например, Leuciscini, Abramidini, Chondrostomini) [Богущая, 1997]. Среди наиболее массовых промысловых видов этого семейства – плотвы (*Rutilus rutilus*) и леща (*Abramis brama*) - численность межвидовых гибридов в отдельных популяциях может достигать 90% [Fahy et al., 1988]. Известно, что у гибридов диагностические морфологические признаки отцовского и материнского видов, как правило, выражены в равной степени. Реципрокные варианты гибридов F1 характеризуются значительной перекрывающейся морфологической изменчивостью, а диагностические аллозимные признаки представлены неразличимыми между собой гетерозиготами. Все это затрудняет изучение последствий межвидовой (межродовой) гибридизации и идентификацию в природных популяциях гибридных генотипов с использованием традиционных морфологических и генетико-биохимических признаков.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение геномной variability и эволюционной изменчивости отдельных митохондриальных и ядерных локусов у ряда представителей карповых рыб из двух наиболее многочисленных подсемейств (Cyprininae и Leuciscinae), распространенных на территории России.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. С помощью геномных маркеров различного типа оценить внутри- и межпородную изменчивость сазана и домашнего карпа (*Cyprinus carpio*) и разработать систему генотипирования, пригодную для паспортизации пород карпа отечественного разведения.

2. По данным секвенирования кодирующих (*cox1*, *cox2*) и некодирующих (контрольный регион, КР) участков митохондриального генома оценить уровень внутри- и межвидовой изменчивости, а также дифференцировать виды карповых, принадлежащих к двум подсемействам *Cyprininae* и *Leuciscinae*.

3. Разработать новые полиморфные ядерные маркеры, пригодные для идентификации экспериментально полученных гибридов первого поколения между плотвой (*Rutilus rutilus*) и лещом (*Abramis brama*).

Научная новизна работы. Впервые на основе различных геномных маркеров получены оценки внутри- и межпородной изменчивости сазана и отечественных пород домашнего карпа. Впервые в индивидуальных экспериментальных скрещиваниях между плотвой (*Rutilus rutilus*) и лещом (*Abramis brama*) доказано наличие индивидуальной изменчивости копий ITS1 рДНК у каждого из родительских видов и межвидовых гибридов первого поколения. Впервые предложены RAPD-маркеры, позволяющие дифференцировать не только родительские виды, но и прямые и реципрокные гибриды первого поколения. Полученные результаты имеют важное значение для понимания факторов, определяющих структуру и вариабельность ядерных и митохондриальных локусов представителей одной из важных групп промысловых объектов – карповых рыб.

Практическое значение работы. Новые полиморфные ДНК, выявленные при изучении сазана и домашнего карпа, пригодны для паспортизации отечественных пород, разводимых в аквакультуре, для картирования генома домашнего карпа и поиска ассоциаций с генами устойчивости к различным заболеваниям, а также для идентификации межвидовых гибридов между плотвой (*Rutilus rutilus*) и лещом (*Abramis brama*).

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции «Генетика в XXI веке: Современное состояние и перспективы развития» (Москва, 6-12 июня 2004 г.), на 9-ой и 12-ой международных школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2005 г., 2008 г.), на международной конференции “World Aquaculture 2005” (Bali, Indonesia, 9-13 May 2005), на международном симпозиуме «Symposium on Hybridization in Animals – Extent, Processes and Evolutionary impact» (Frankfurt-am-Main, Germany, 12-15 October 2005), на рабочем совещании «Штрих-кодирование видов рыб в России на основе ДНК. Интеграция в глобальную программу Fish-BOL» (ИБМ РАН, Владивосток, 12-15 июня 2007 г.), на 12-ом международном Ихтиологическом конгрессе (Dubrovnik, Croatia, 9-13 сентября 2007 г.), а также на межлабораторном семинаре ИБГ РАН (2008 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, в том числе две статьи и один патент.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на **120** страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы (285 источников), раздела благодарностей и приложения (16 страниц).

Работа включает 16 таблиц и 18 рисунков.

МАТЕРИАЛ

В исследовании использовали 12 породных выборок домашнего карпа и сазана (*Cyprinus carpio*) (N= 99), а также образцы различных тканей рыб, принадлежащих к двум подсемействам Cyprininae и Leuciscinae и обитающих в водоемах Волжского бассейна (N= 18) (Табл.1). Для сравнительного анализа были использованы нуклеотидные последовательности участков митохондриального (КР, *cox1*, *cox2*) и ядерного (ITS1 рДНК) геномов представителей семейства карповых (Cyprinidae) из базы данных NCBI.

Таблица / Список использованных в работе видов и нуклеотидных последовательностей карповых рыб.

Вид (русское и латинское названия)	Обозначение	NCBI	cox1	cox 2	КР
Подсемейство Cyprininae					
Амурский сазан	<i>Cyprinus carpio</i>	As	-	+	+
Венгерский карп	<i>Cyprinus carpio</i>	Hu	-	+	+
Ангельский чешуйчатый и зеркальный карп	<i>Cyprinus carpio</i>	An1, An2	-		+
Ропшинский карп	<i>Cyprinus carpio</i>	R (MM, BB)	-		+
Алтайский карп (приобская, чумьшская и дикая популяции)	<i>Cyprinus carpio</i>	Al 1, Al 2, Al 3	-		+
Ставропольский карп	<i>Cyprinus carpio</i>	St	-		+
Черенетский карп	<i>Cyprinus carpio</i>	Tch1, Tch2	-		+
Карась обыкновенный	<i>Carassius carassius</i>		-	+	+
		AY714387		+	+
Карась серебряный	<i>Carassius auratus</i>		-	+	+
		AB111951		+	+
Getman mirror carp	<i>Cyprinus carpio</i>	GMC	NC33642225		+
Russian mirror carp	<i>Cyprinus carpio</i>	RMC	NC33642228		+
Volga River carp	<i>Cyprinus carpio</i>	VRC	NC33642234		+
Yangtze River carp	<i>Cyprinus carpio</i>	YRC	NC33642226		+
Xingguo River carp	<i>Cyprinus carpio</i>	XRC	NC33642227		+
Qinguan carp	<i>Cyprinus carpio</i>	QTC	NC33667853		+
Japanese Koi carp	<i>Cyprinus carpio</i>	JKC	NC33667854		+
Purse red carp	<i>Cyprinus carpio</i>	PRC	NC33997856		+
Big belly carp	<i>Cyprinus carpio</i>	BBC	NC33667859		+
Yuanjiang River wild carp	<i>Cyprinus carpio</i>	YWC	NC33887858		+
Карп	<i>Cyprinus carpio</i>		AP009047	+	+
			AB307063	-	+
Подсемейство Leuciscinae					
Лещ обыкновенный *	<i>Abramis brama</i>		-	+	+
			AY704448	-	+
			AJ388404	-	+
Синец	<i>Abramis ballerus</i>		-	+	+
Уклейка	<i>Alburnus alburnus</i>		-	+	+
			AY704448	+	+
Густера	<i>Blicca bjoerkna</i>		-	+	+
			AJ388405	-	+
Пескарь обыкновенный	<i>Gobio gobio</i>		-	+	+
			AB239596	+	+
Пескарь белоперый	<i>Gobio albipinnatus</i>		-	+	+
Язь	<i>Leuciscus idus</i>		-	+	+
Елец сибирский	<i>Leuciscus leuciscus</i>		-	+	+
			AY704459	+	+
Плотва*	<i>Rutilus rutilus</i>		-	+	+
			AY704466	-	+
Красноперка	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>		-	+	+
			AJ388403	-	+
Голавль	<i>Leuciscus cephalus</i>		-	+	+
			AJ388407	-	+

*- номера занесенных в GenBank последовательностей ITS1 рДНК плотвы и леща из водохранилищ Англии: AM183339-AM183345.

Для изучения последствий гибридизации между плотвой (*Rutilus rutilus*) и лещом (*Abramis brama*) изучено потомство (N= 22), полученное в восьми индивидуальных скрещиваниях: ♀ плотва x ♂ плотва (ПП, n=1), ♀ лещ x ♂ лещ (ЛЛ, n=1), ♀ плотва x ♂ лещ (ПЛ, n=3) и ♀ лещ x ♂ плотва (ЛП, n=3) (Экспериментальные образцы любезно предоставлены Ю. Слынько и В. Столбуновой, сотрудниками Института биологии внутренних вод РАН им. А. Д. Папанина, пос. Борок Ярославской области, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Дифференциация отечественных пород карпа и сазана с помощью ядерных и митохондриальных маркеров.

Для дифференциации отечественных пород карпа и сазана нами использовались различные ядерные маркеры (микросателлиты (МКС) и RAPDs). Применение каждой из этих групп выявило принципиально сходную дифференциацию 10-11 изученных выборок, и она почти без исключения соответствует истории происхождения пород. Образцы RAPD-спектров карпа и сазана представлены на Рис. 1.

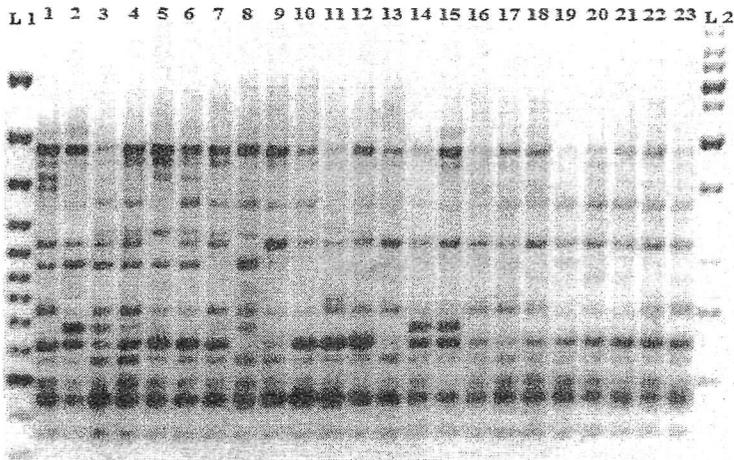
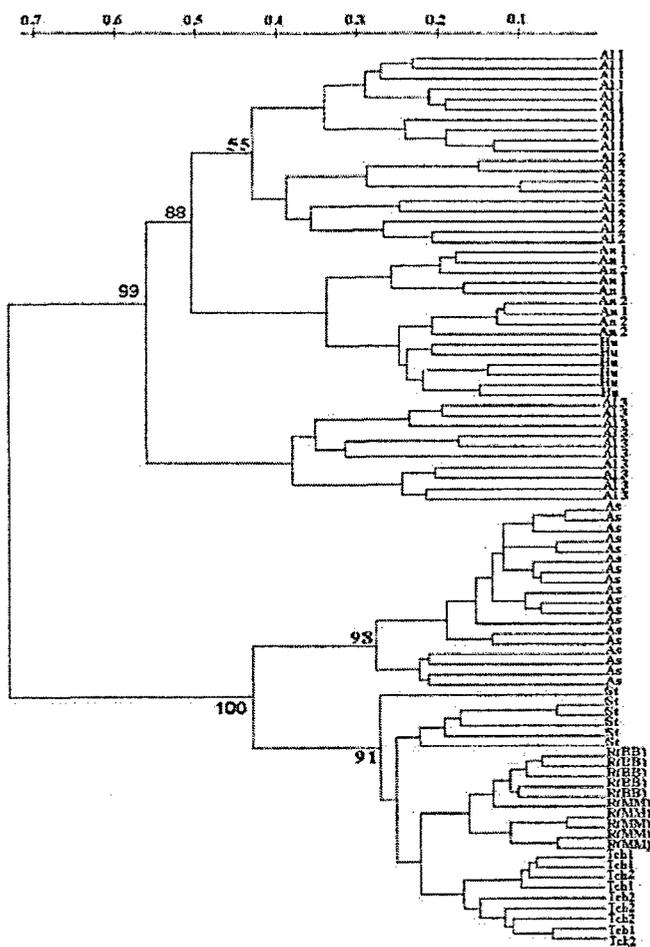


Рисунок 1 RAPD-спектры амурского сазана (дор. 1- 9), ставропольского (дор. 10 - 14), черепецкого (дор. 15 - 19) и ропшинского (дор. 20 - 23) карпа, полученные при использовании праймера R45. L1, L2 – маркеры молекулярных масс (100 bp и 500 bp Ladder, соответственно).

Как по RAPDs, так и по 8 микросателлитным локусам в одну группу сходства объединились амурский сазан (As) и породы, полученные на основе амурского сазана - ропшинские (BB и MM), а также ставропольский карп (St). Однако более достоверное выделение представителей амурского сазана в отдельную группу установлено лишь с помощью RAPDs.

A



Б

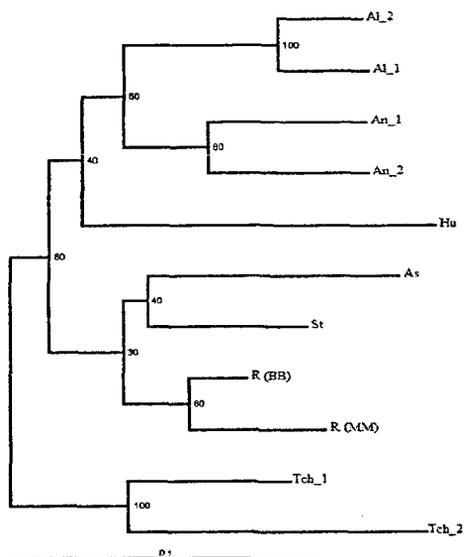


Рисунок 2 Генетические различия между 12 выборками, представляющими 8 пород карпа и сазана, выявляемые с помощью (А) RAPD маркеров (132 аллеля) и (Б) частот изменчивости 8 микросателлитных локусов (122 аллеля).

Вторую группу пород, произошедшую от европейского карпа, формируют несколько выборок: венгерский (галицийский) карп (Hu), а также две выборки ангелинского (An1 и An2) и алтайского карпа (AI1 и AI2). Что же касается двух выборок черепетского карпа, то они объединяются либо в отдельную, не сходную ни с какими выборками группу по микросателлитным локусам, либо входят в состав RAPD- кластера пород, полученных на основе амурского сазана.

Помимо ядерных маркеров, для дифференциации сазана и карпа из разных регионов России использовали последовательности некодирующего участка мтДНК – контрольного региона (КР). На основании 44 последовательностей отечественного карпа и сазана, а также занесенных в Международный банк последовательностей китайского сазана, европейского (GMC) и волжского (VRC) карпа из работы китайских исследователей, нами построена дендрограмма генетических различий (Рис. 3). Все последовательности КР формируют две

группы, в одну из которых вошла почти половина азиатских сазанов. В другую группу объединились часть оставшихся азиатских сазанов и все отечественные породы карпа, включая амурского сазана.

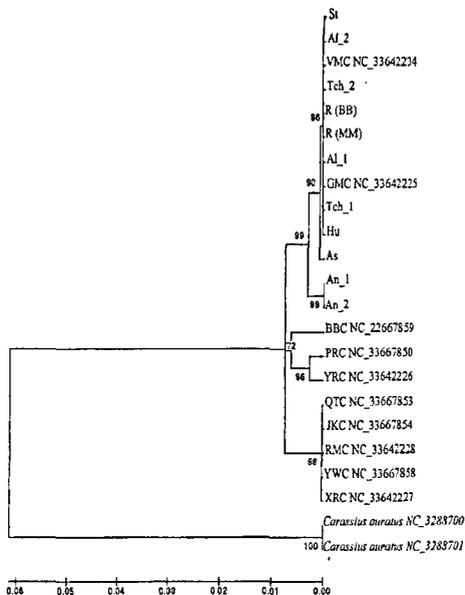


Рисунок 3. Дендрограмма генетических различий (метод NJ и двухпараметрическая модель Кимуры) между последовательностями КР карпа и сазана из отечественных и азиатских популяций. Обозначения пород и выборки соответствуют Табл. 1.

Однако низкий уровень внутривидовой изменчивости КР у *C. carpio* позволяет достоверно дифференцировать внутри этой группы лишь несколько отечественных пород. Так, за счет мутаций обособлены две породы ангелинских карпов (An1, An2), а также последовательности амурского сазана (As).

2. Изменчивость кодирующих (*cox1* и *cox2*) и некодирующих участков (КР) мтДНК у карповых рыб из двух подсемейств.

На Рис. 4 представлены филогенетические реконструкции видов карповых из двух подсемейств, полученные на основании полиморфизма объединенной последовательности генов *cox1+cox2* (А) и КР мтДНК (Б) у представителей 13 видов карповых рыб, обитающих в реках Волжского бассейна. Они получены впервые для большинства изученных нами

видов, несмотря на обилие в GenBank полных последовательностей мтДНК карповых рыб из разных частей мирового ареала. Очевидно, что изученные нами волжские виды карповых немного отличаются от известных депонированных последовательностей уклейки, обыкновенного пескаря, двух видов карасей и европейского карпа. Общее разделение видов соответствует принятому разделению на два подсемейства Cyprininae и Leuciscinae, а также выделению внутри них отдельных родов Cyprinus, Carassius, Gobio. Соответствуют, в основном, выделению в отдельные роды виды *Alburnus alburnus* и *Scardinius erythrophthalmus*. Дифференциация оставшихся видов из родов *Abramis*, *Leuciscus* и *Rutilus* зависит от исследуемого локуса мтДНК. Например, по генам *cox1* и *cox2* отдельные подкластеры формируют пары видов *A. brama* + *B. bjoerkna*, *R. rutilus* + *A. ballerus*, а также два вида ельцов *L. idus* и *L. leuciscus*. На основании полиморфизма КР надежная группировка обнаружена только *A. brama* + *B. bjoerkna* + *A. ballerus*. Оставшиеся плотва и два вида ельцов образуют смешанную группу, в состав которой попадает и группа *Alburnus* + *Scardinius*.

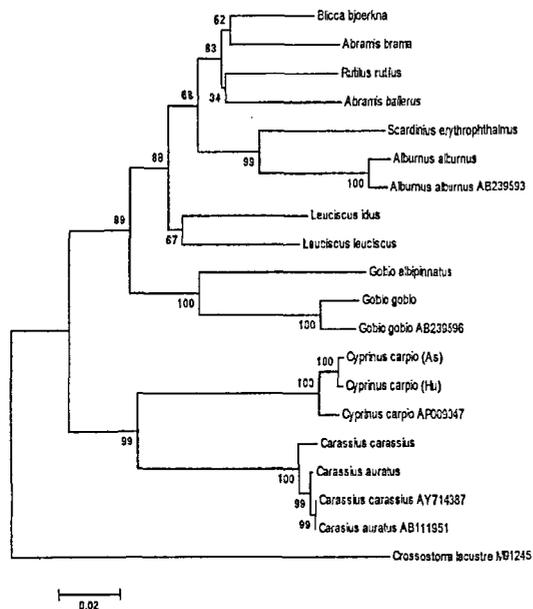
Таблица 2. Сравнительный анализ полиморфизма трех участков мт генома (*cox1*, *cox2* и КР) у представителей двух подсемейств карповых рыб.

Подсемейство	N	S	Ps	$\pi (\pm \sigma)$
<i>cox1</i> + <i>cox2</i>				
Cyprininae	4	264	0.0151	0.0797 (0.051)
Leuciscinae	10	573	0.0174	0.1030 (0.054)
КР				
Cyprininae	4	136	0.0317	0.0941 (0.060)
Leuciscinae	10	404	0.0283	0.1574 (0.083)

Обозначения: N – число последовательностей; S - число сегрегирующих сайтов; Ps = S/N; π – среднее нуклеотидное разнообразие.

В табл.2 даны результаты анализа вариабельности кодирующих (*cox1*, *cox2*) и некодирующих (КР) участков мт генома у представителей двух подсемейств. При сравнении двух таксономических групп оказалось, что они не отличаются между собой по среднему числу сегрегирующих сайтов Ps и по уровню нуклеотидного разнообразия (π) генов *cox1* + *cox2*. Значимые межгрупповые различия найдены при сравнении индексов Ps и π в некодирующих участках мтДНК (КР).

Б



А

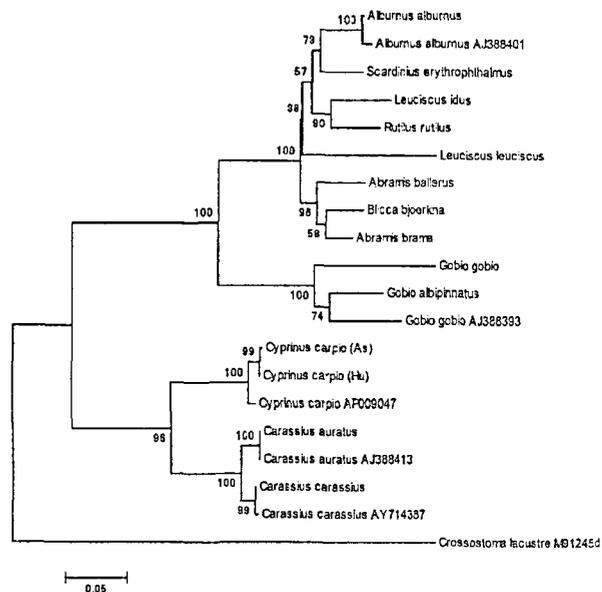


Рисунок 4А - Филогенетическое дерево (ML, НКY+I+G, $-\ln L = 8539.52169$, $R = 4.0109$, $P\text{-inv} = 0.68$, $\gamma = 1.5218$) карповых рыб из двух подсемейств, построенное на основании полиморфизма генов *cax1+cox2*. Б - Филогенетическое дерево (ML, НКY+I, $-\ln L = 2320.2856$, $R = 1.4171$, $P\text{-inv} = 0$, $\gamma = 0.3919$) карповых рыб из двух подсемейств, построенное на основании полиморфизма КР. В качестве внешней группы выбрана последовательность *Crossoptoma lacustre* (M91245).

3. Геномная вариабельность плотвы (*Rutilus rutilus*), леща (*Abramis brama*), межвидовых гибридов первого поколения (F1) лещ х плотва и плотва х лещ.

3.1. Полиморфизм ядерных маркеров в природных популяциях плотвы и леща.

Для сравнения генетической изменчивости в природных популяциях плотвы и леща использовали четыре случайных праймера (OPA17, R45, P29, SB2). В Табл. 3 даны результаты сравнительного анализа RAPD-изменчивости двух видов, рассчитанные на основании суммарной матрицы. Оба вида отличаются между собой как по общему числу выявляемых RAPD фрагментов (114 - у леща и 141 - у плотвы), так и по средним значениям (95.4 и 97.6). У плотвы доля полиморфных фрагментов оказалась ниже (57%), чем у леща (74%). Аналогичная закономерность наблюдается и при сравнении индексов внутригруппового сходства. Он составил для леща 68%, тогда как выборка плотвы оказалась более однородной (80%).

Таблица 5 RAPD-полиморфизм в природных выборках плотвы и леща, полученный при использовании четырех случайных праймеров.

Вид	n	L	P (%)	N ($\pm\sigma$)	APS (%)
Лещ <i>Abramis brama</i>	5	14	74.0 ^a	95.4 (2.6) ^b	68 ^c
Плотва <i>Rutilus rutilus</i>	5	141	57.0 ^a	97.6 (5.07) ^b	80 ^c

Примечание: n - численность выборки; L - общее число RAPD-фрагментов (локусов); P (%) – доля полиморфных RAPD-фрагментов; N ($\pm\sigma$) – среднее число RAPD-фрагментов (\pm стандартное отклонение); APS - индекс внутригруппового сходства. Надстрочные буквы a, b и c обозначают наличие достоверных различий при парных выборочных сравнениях ($p < 0.0001$).

Для изучения вариабельности ITS1 у леща и плотвы из природных популяций было отобрано по четыре особи каждого вида. Амплификация участка ITS1 рДНК выявила для каждого и видов специфичные, немного различающиеся по длине единичные фрагменты около 300 пп. Последовательности семи таких фрагментов, полученных от четырех особей плотвы и трех особей леща, определялись прямым секвенированием (Рис. 5, Rr 1 – Rr 4, Ab 1 – Ab 3). Для выявления изменчивости изучаемого участка рДНК внутри отдельных особей были клонированы продукты амплификации ITS1 одного леща (Ab 4) и одной плотвы (Rr 4). Из клонотек были отобраны для секвенирования два клона леща (Ab 4c1, Ab 4c2) и шесть клонов плотвы (Rr 4c1 – Rr 4c6). Для выравнивания были использованы последовательности

четырёх гаплотипов ITS1, обнаруженных у плотвы и леща из водосмов Англии (гаплотипы А и В) [Wyatt et al., 2006].

Таблица 4 Характеристика нуклеотидных последовательностей ITS1 рДНК плотвы и леща из водосмов Англии [AM 183339- AM183342] и Рыбинского водохранилища.

Вид	n	L (пн.)	AT/GC (%)	Число и доля (P, %) полиморфных сайтов
<u>Лещ <i>A. brama</i>:</u>	1		42/58	8 (2.3)
Тип А [AM183341]		342		
Тип В [AM183342]		343		
Рыбинское вдхр.		338, 339		6 (1.8)
<u>Плотва <i>R. rutilus</i>:</u>	1		41/59	1 (0.3)
Тип А [AM183339]		320		
Тип В [AM183340]		319		
Рыбинское вдхр.		320, 321		2 (0.6)

Примечание: n - численность выборок, L – размер последовательности ITS1 (пн.).

При межвидовом сравнении консенсусных последовательностей ITS1 выявлены 31 уникальная видоспецифичная замена и/или индели, составляющие 12.6% (Рис. 6). Диагностическими для леща являются локализованная ближе к 5'-концу 12-нуклеотидная делеция (5' TGCCAGCCTCTA 3'), а также делеции двух (AC) и трех нуклеотидов (ATT) в середине последовательности. Наличие этих делеций и вызывает заметное изменение длины ITS1 плотвы и является диагностическим признаком при электрофоретическом разделении продуктов амплификации.

3. 2. Полиморфизм ядерной ДНК в экспериментальных популяциях плотвы, леща и гибридов плотва x лещ, лещ x плотва.

Для изучения последствий гибридизации между плотвой и лещом были исследованы два варианта экспериментальных скрещиваний. В первом варианте с помощью восьми случайных праймеров обследованы только четыре группы потомков, полученных в четырех индивидуальных скрещиваниях ♀плотва x ♂плотва (ПП), ♀лещ x ♂лещ (ЛЛ), ♀плотва x ♂лещ (ПЛ) и ♀лещ x ♂плотва (ЛП). Во втором варианте поставлены четыре межвидовых скрещивания плотвы с лещом [два скрещивания ♀лещ x ♂плотва и два скрещивания ♀плотва x ♂лещ] и обследованы не только потомки, но и родительские особи.

	199	AAG	GGG	ACC	GTG	GGT	TTA	AAG	ACC	TCC	TCC	TCC	CTC	CCC	CGT	GGG	TGG	AGG	AGT	GGG	CGC	CCG	TCC	GGG	TCT	CGC	CAC	CCA	TTT	ATT	TTT	TTT	CCC	CAT	
Ab AM183339 TypeA
Ab Am183340 TypeB
Ab 1
Ab 2
Ab 3
Ab 4 c1
Ab 4 c2
HybF1Ab c1
HybF1Ab c2
Rr 1	A..	T..	A..	CC..	G..	G..	
Rr 2	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rr 3	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rr 4 c1	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rr 4 c2	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rr 4 c3	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rr 4 c4	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rr 4 c5	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rr 4 c6	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
HybF1Rr c1	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
HybF1Rr c2	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rr AM183341 TypeA	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rr AM183342 TypeB	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rec Rr/Ab AM183343	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rec Rr/Ab AM183344	A..	T..	A..	CC..	G..	G..
Rec Rr/Ab AM183345	A..	T..	A..	CC..	G..	G..

	298	GCC	TCG	GTT	TGT	GTC	GGT	CGG	CCT	CGA	AAA	-CC	AAA	AAA	-CA	CTC	AAG	TGT	348
Ab AM183339 TypeA
Ab Am183340 TypeB
Ab 1
Ab 2
Ab 3
Ab 4 c1
Ab 4 c2
HybF1Ab c1
HybF1Ab c2
Rr 1
Rr 2
Rr 3
Rr 4 c1
Rr 4 c2
Rr 4 c3
Rr 4 c4
Rr 4 c5
Rr 4 c6
HybF1Rr c1
HybF1Rr c2
Rr AM183341 TypeA
Rr AM183342 TypeB
Rec Rr/Ab AM183343
Rec Rr/Ab AM183344
Rec Rr/Ab AM183345

Рисунок 5.

Полиморфизм копий ITS1, обнаруженных у плотвы и леща из природных популяций Англии (плотва: тип А - AM183341, тип В - AM183342; лещ: тип А - AM183339, тип В - AM183340) и Рыбинского водохранилища (Ab 1 – Ab 3, Ab4 c1, Ab4 c2, Rr 1 – Rr 4, Rr4 c1 - Rr4 c6), а также у рекомбинантов из природных популяций Англии (AM183343 - AM183345) и гибридов HybF1 Rb, HybF1 Ab из экспериментальных скрещиваний между плотвой и лещом Рыбинского водохранилища.

В каждом из последних четырех скрещиваний для идентификации видовой принадлежности родителей и диагностики гибридов первого поколения использованы последовательности ITS1 рДНК.

3. 3. Полиморфизм RAPD маркеров в экспериментальных популяциях плотвы, леща и гибридов плотва x лещ, лещ x плотва.

При анализе RAPD вариабельности потомства от четырех индивидуальных скрещиваний с помощью 8 случайных праймеров (OPA-11, OPA-17, OPA-19, OPA-20, R-45, R-55, P-29, SB-2) удалось дифференцировать не только родительские виды (плотву и леща), но дифференцировать гибридов от прямого (лещ x плотва, ЛП) и обратного (плотва x лещ, ПЛ) скрещиваний. Образец такой изменчивости потомков от внутри- и межвидовых скрещиваний, полученной с помощью праймера SB2, представлен на Рис. 6. Несмотря на небольшое число производителей, участвующих в скрещиваниях, все четыре выборки потомков оказались высокополиморфными. Доля полиморфных локусов в суммарной выборке составляет 97.6%, у плотвы и леща - 75% и 77.8%, а у гибридов - 86.3% (ПЛ) и 84.9% (ЛП).

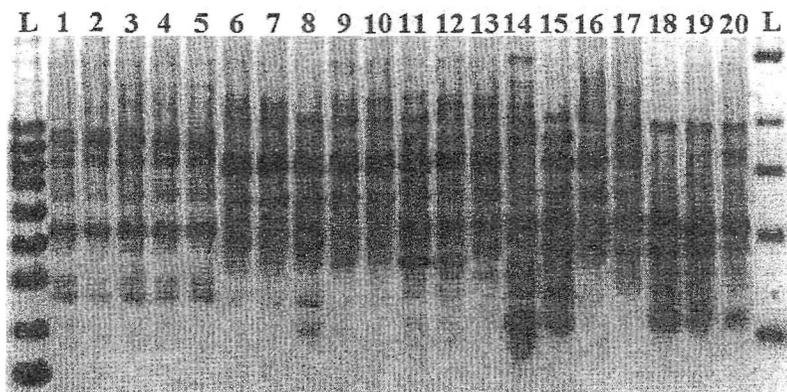


Рисунок 6. RAPD-спектры плотвы (дор. 1-5), леща (дор. 16-20) и межвидовых гибридов первого поколения плотва x лещ (дор. 6-10) и лещ x плотва (дор. 11-15), полученные с помощью праймера SB-2. L - маркеры молекулярных масс (100 bp и 500 bp Ladder).

Для классификационного анализа выборок в пространстве главных компонент были отобраны первые четыре компоненты, на которые приходится 26.8%, 16.8%, 11.5% и 8.9% общей изменчивости. В пространстве I и II компонент отчетливо дифференцируются особи двух исходных видов и гибридное потомство (без дифференциации на группы прямых и обратных гибридов). Разделение особей всех четырех групп (ПП, ЛЛ, ПЛ и ЛП) достигается в пространстве II и III компонент (Рис. 7).

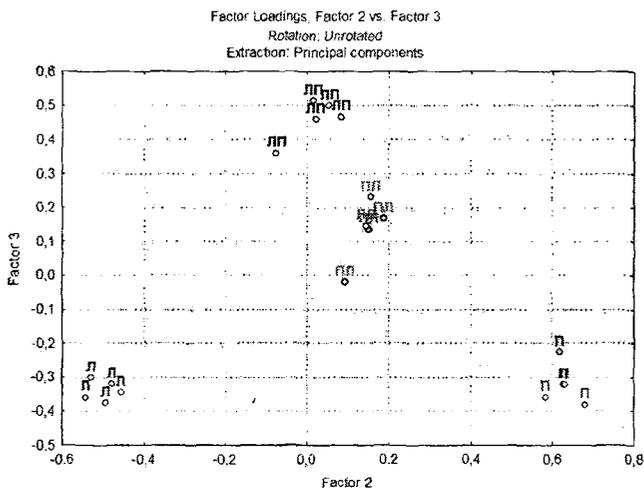


Рисунок 7. Классификационный анализ в пространстве главных компонент (II и III) по 288 RAPD-маркерам, выявленных в выборках плотвы (П), леща (Л), гибридов первого поколения плотва x лещ (ПЛ) и лещ x плотва (ЛП).

3. 4. Полиморфизм ITS1 рДНК в экспериментальных популяциях плотвы, леща и гибридов плотва x лещ, лещ x плотва.

Последовательность ITS1 изучена в четырех экспериментально полученных семьях (родители и потомство F₁). В двух семьях потомство F₁ было получено при скрещивании самки плотвы и самца леща (семьи №№ 2 и 3), а в двух других семьях (№№ 1 и 4) - при скрещивании самки леща и самца плотвы. На Рис. 8 даны результаты амплификации ITS1 родителей и трех потомков из каждой семьи. Независимо от направления скрещивания

у всех потомков обнаружено по два фрагмента, один из которых по размеру был сходен с ITS1 леща, а другой – с ITS1 плотвы.

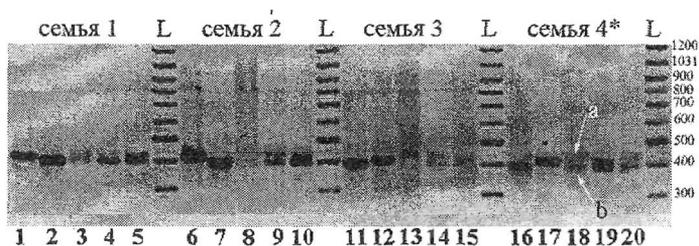


Рисунок 8. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов ITS1 родительских видов (леща – дор. ♂1, ♂6, ♀12, ♀17; плотвы – дор. ♀2, ♀7, ♂11, ♂16) и гибридов первого поколения (дор. 3-5, 8-10, 13-15, 18-20) в четырех экспериментальных скрещиваниях (семьи №№ 1-4). Стрелками указаны клонированные и секвенированные ампликоны одного из гибридных потомков (дор. 18) из семьи №4 (обозначена звездочкой*). L – маркер молекулярных масс (100 bp Ladder).

Для родительских видов во всех четырех скрещиваниях наблюдалась равная по интенсивности мажорная амплификация участка ITS1 рДНК. Однако спектры гибридного потомства во всех семьях различались по интенсивности родительских фрагментов. Поэтому для дальнейшего анализа нуклеотидных последовательностей гибридного потомства нами выбран наиболее «типичный» спектр одного из потомков (дор.18) из семьи №4 (отмечен на Рис. 8 звездочкой*). Оба фрагмента, отмеченных на этом рисунке стрелками (a – «лещовый») и b – «плотвинный»), были клонированы. Для определения нуклеотидной последовательности отобрано 2 клон из клонотеки «a» (HybF1Ab c1-2) и 6 клонов из клонотеки «b» (HybF1Rr c1-6). Их последовательности выравнены относительно известных последовательностей леща и плотвы из водоемов Англии и Рыбинского водохранилища (Рис. 5). Для изображения различий и сходства между полученными и ранее известными последовательностями ITS1 рДНК плотвы, леща и гибридов первого поколения была построена сеть гаплотипов (Рис. 9), которая убедительно демонстрирует генетическую неоднородность индивидуальных копий ITS1 у плотвы и леща, а также подтверждает высокий уровень межвидовых отличий. Известные гаплотипы А и В из Англии отличаются между собой лишь делецией одного нуклеотида. Копии ITS1, обнаруженные у волжской плотвы, либо идентичны гаплотипу А (Rr 2), либо, в основном, отличаются от него одной (Rr 1, Rr 3, Rr4 c1-6, HybF1 Rrc1)

нуклеотидной заменой. Две замены найдены только в геноме гибрида HybF1 (Rrc2). Заметим, что именно у этого гибрида найдены две наиболее различающиеся копии HybF1 Rrc1 и HybF1 Rrc2. Более значимая дивергенция между копиями ITS1 рДНК характерна для леща. Она основана не только на более значимых расхождениях между гаплотипами А и В, состоящими в присутствии 9 замен/делечий. При сравнении пяти копий ITS1, обнаруженных у волжского леща, оказалось, что ни одна из них не имеет полной идентичности с известными гаплотипами А и В.

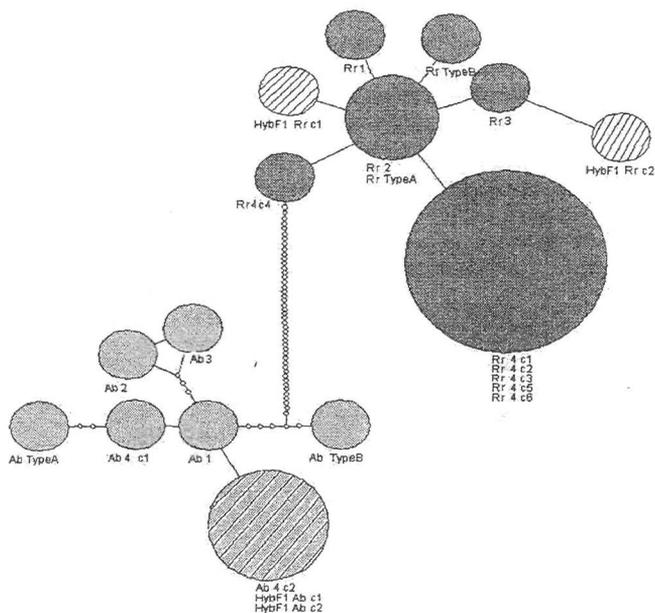


Рисунок 9. Сеть гаплотипов ITS1 леща и плотвы из природных популяций Англии (плотва: тип А - AM183341, тип В - AM183342; лещ: тип А - AM183339, тип В - AM183340) и Рыбинского водохранилища (Ab 1 – Ab 3, Ab4 c1, Ab4 c2, Rr 1 – Rr 4, Rr4 c1 - Rr4 c6), а также гибридов (HybF1 Rb, HybF1 Ab) из экспериментальных скрещиваний между плотвой и лещом Рыбинского водохранилища. Площади кругов соответствуют числу обнаруженных копий (гаплотипов) ITS1, обозначения копий – как на Рис. 9. Последовательности леща выделены светло-серым цветом, плотвы - темно-серым, а гибридов - штриховкой на светло-сером («лещовый» тип а) и темно-сером («плотвинный» тип б) фоне.

У гибрида обе «лещовых» копии (HybF1Ab c1, c2) идентичны одной из родительских копий Ab4 c2. Другая родительская копия Ab4 c1 имеет три замены по сравнению с

гаплотипом А. Очень похожа на нее и последовательность Ab1, полученная при прямом секвенировании тотального амплификата *ITS1* одного из волжских лещей. И совершенно иной полиморфизм найден у двух других лещей (Ab2, Ab3) из Рыбинского водохранилища. Между собой они отличаются единичной мутацией, тогда как по 4 другим мутациям одинаково отстоят как от гаплотипа А, так и от гаплотипа В, представляя третью, ранее неизвестную линию гаплотипов С. С этой точки зрения копии *ITS1* рДНК лещей Ab1, Ab2, Ab3 и Ab4 можно рассматривать как производные линии С.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предлагаемые нами наборы ядерных маркеров демонстрируют различную внутривидовую изменчивость. Так, среди 12 обследованных выборок наиболее высокие оценки RAPD-изменчивости получены для дикого алтайского карпа, ангелинского карпа и в чумышской популяции алтайского карпа ($P = 23.8\% - 22.6\%$, $H \sim 11\%$). В остальных изученных группах эти значения уменьшаются до $17\% - 15\%$, достигая своего минимального значения 12.8% у одной из линий (ВВ) ропшинского карпа. При использовании МКС максимальные оценки аллельного разнообразия обнаружены у сазана (7.14) и алтайского дикого карпа (8.57), а минимальные - у черепетских (4.17 и 4.29) карпов. По сравнению с RAPDs, МКС оказались более информативными для дифференциации пар пород или линий, имеющих общее происхождение, а именно, двух пород ангелинского, двух линий ропшинской и алтайской пород карпа. Несмотря на малый объем исследуемых выборок нами также обнаружено, что в общей бинарной матрице для любой из пород присутствуют несколько породоспецифичных МКС-аллелей, сочетания которых могут служить надежным диагностическим признаком при составлении генетического паспорта породы. Очевидно, что с увеличением исследуемых выборок и числа используемых МКС такой принцип позволит получить надежные генотипические паспорта отдельных пород.

Таким образом, независимо от специфики используемых ядерных маркеров дифференциация пород карпа отечественной селекции, за редким исключением,

соответствует истории происхождения этих пород, одни из которых произошли от карпа европейской селекции, а другие содержат значительную примесь амурского сазана. Различия в последовательностях КР свидетельствует о том, что каждая из этих породных групп произошла от европейского *C. c. carpio* или дальневосточного сазана *C. c. haematopterus*. Этот вывод согласуется с распространенной точкой зрения, основанной на генетических и морфо-физиологических данных [Берг, 1949; Balon, 1995; Решетников, 2002; Kolman, 2000]. Сравнение полиморфизма КР у карпов и сазанов из Китая и Европы выявило более высокое разнообразие гаплотипов в китайских популяциях сазана. Учитывая их значительную дивергенцию можно предположить, что некоторые из этих последовательностей являются предковыми, по отношению ко многим современным карпам, разводимым в Евразии.

Еще один из основных результатов данного исследования состоял в выявлении индивидуальной и популяционной неоднородности ITS1 рДНК двух видов - плотвы (*R. rutilus*) и леща (*A. brama*). Ранее аналогичное явление зарегистрировано в популяциях плотвы и леща из водоемов Англии. Эта неоднородность заключалась в одновременном присутствии у одной и той же особи или в популяциях одного и того же вида нескольких копий, или гаплотипов, ITS1. При сравнении английских и российских популяций показано, что различия между копиями состояли в наличии небольшого числа единичных инделей/мутаций и оказались более выраженными у леща, чем у плотвы. В дополнение к двум основным известным типам (копиям) А и В, в геноме волжского леща найдено несколько уникальных, значительно дивергировавших копий ITS1, что позволяет нам предположить существование на изученном ареале третьей линии С. Кроме того, впервые для анализа последовательностей ITS1 из генома двух видов карповых поставлены индивидуальные межвидовые скрещивания, подтвердившие присутствие в спектрах одного из экспериментальных гибридов наличие родительских копий ITS1.

В другом варианте индивидуальных скрещиваний, при анализе RAPD - вариабельности потомства с помощью 8 случайных праймеров, нам удалось

дифференцировать не только родительские виды (плотва и лещ), но впервые идентифицировать гибридов от прямого (лещ x плотва) и обратного (плотва x лещ) скрещиваний.

Для изучения геномной вариабельности кодирующих (*cox1* и *cox2*) и не кодирующих участков (КР) мтДНК карповых рыб из двух наиболее многочисленных подсемейств карповых – Cyprininae и Leuciscinae - мы впервые попытались реконструировать молекулярно-филогенетические связи между представителями 13 видов карповых рыб, обитающих в реках Волжского бассейна. Показано, что разделение изученных видов соответствует принятому разделению на два подсемейства. Объединение в отдельные группы таксонов более низкого ранга в большинстве случаев зависит от исследуемого участка мтДНК, т.е. связано с особенностями геномных реорганизаций, происходящих в процессе эволюции в структурных генах и регуляторных последовательностях. Например, независимо от изученных митохондриальных маркеров в отдельные кластеры группировались среди Cyprininae представители родов Cyprinus и Carassius. Среди ельцовых (Leuciscinae) только виды *Gobio sp.* всегда формировали отдельную группу. Кластеризация в родственные группы среди оставшихся видов ельцовых (роды *Abramis*, *Leuciscus*, *Rutilus*, *Alburnus*, *Scardinius*) весьма неоднозначна. Так, например, на основании вариабельности кодирующих последовательностей можно надежно выделить отдельные подкластеры, содержащие пары таких видов, как *A. brama* + *B. bjoerkna*, *R. rutilus* + *A. ballerus*, а также *L. idus* и *L. leuciscus*. На основании полиморфизма КР надежная группировка обнаружена только для видов *A. brama* + *B. bjoerkna* + *A. ballerus*. Оставшиеся плотва и два вида ельцов образуют смешанную группу, в состав которой попадает и группа *Alburnus* + *Scardinius*. На аналогичные противоречия в объединении видов из разных триб у ельцовых, характеризующихся множественной парафилией, указывалось ранее при изучении кодирующих участков полных мт геномов у большого числа карповых [Saitoh et al., 2006].

ВЫВОДЫ

1. Показано, что независимо от специфики используемых ядерных маркеров (RAPDs или микросателлиты) дифференциация пород карпа отечественной селекции соответствует истории происхождения этих пород, одни из которых произошли от карпа европейской селекции, а другие содержат значительную примесь амурского сазана.

2. Впервые получены последовательности участков митохондриальной ДНК (гены *cox1* и *cox2* и контрольный регион) и на их основе дифференцированы 13 видов карповых рыб из подсемейств *Surginae* и *Leuciscinae*, обитающих на территории России. Показано, что общее разделение изученных видов соответствует принятому разделению на два подсемейства, а объединение в отдельные группы таксонов более низкого ранга у сльцовых (п/сем. *Leuciscinae*) в большинстве случаев зависит от исследуемого участка мтДНК.

3. Обнаружена индивидуальная изменчивость копий ITS1 рДНК в геноме плотвы (*Rutilus rutilus*) и леща (*Abramis brama*) из российских природных популяций. Она связана с наличием в геноме точковых мутаций и/или единичных инделей, число которых у леща выше, чем у плотвы.

4. Сравнение распределений различных копий ITS1 рДНК в популяциях леща (*Abramis brama*) из Англии и России свидетельствует о повышенном генетическом разнообразии и генетической уникальности волжского леща.

5. В экспериментальных скрещиваниях между плотвой (*Rutilus rutilus*) и лещом (*Abramis brama*) доказано, что последовательности ITS1 рДНК пригодны для идентификации родительских видов и гибридов первого поколения. Кроме того, разработанные RAPD-маркеры позволяют дифференцировать не только родительские виды, но и дифференцировать прямые и реципрокные гибриды первого поколения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Г.Г. Хрисанфова, **Р.И. Луданный**, Ю.В. Слышко, В. Н. Яковлев, С. К. Семенова. RAPD-фingerprintинг леща (*Abramis brama L.*), плотвы (*Rutilus rutilus L.*) и гибридов первого поколения лещ x плотва и плотва x лещ. Генетика 2004, 40, (10): 1182 - 1185.
2. **Р. И. Луданный**, Г. Г. Хрисанфова, В. А. Васильев, В. К. Призенко, А. К. Богерук, А. П. Рысков, С. К. Семенова. Генетическое разнообразие и дифференциация отечественных пород карпа (*Cyprinus carpio*), выявляемая с помощью RAPD-маркеров. Генетика 2006, 42 (8): 928-935.
3. Семенова С. К., Хрисанфова Г. Г., Луданный Р. И., Рысков А. П., Призенко В. К., Богерук А. К. Биологический маркер для определения пород рыб, набор и способы определения породной принадлежности рыб. Патент на изобретение № 2294633, зарегистрирован 10.03.07.
4. В. А. Васильев, Е. К. Филиппова, **Р. И. Луданный**, В. К. Призенко, А. К. Богерук, Г. Г. Хрисанфова. RAPD fingerprintинг и генетическая паспортизация Амурского сазана и отечественных пород карпа (*Cyprinus carpio*). Сборник трудов конференции ВОГиС «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития», Москва, 6-12 июня 2004 г., с. 196.
5. Г. Г. Хрисанфова, **Р. И. Луданный**, В. А. Васильев, Е. К. Филиппова, В. К. Призенко, С. К. Семенова. Генетическая паспортизация сазана и отечественных пород карпа (*Cyprinus carpio*). Материалы международной конференции «Сохранение генетических ресурсов» Санкт-Петербург, 19-22 октября 2004г., Цитология, 46 (10):876.
6. Луданный Р. И. Геномное типирование карпа (*Cyprinus carpio*) и проблема эволюции карповых рыб. Сборник тезисов 9-ой международной пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино 2005, с.156
7. A. K. Boguerouk, S. K. Semyenova, G. G. Chrisanfova, **R. I. Ludanny**, V. A. Vasilyev, E. K. Filipova, V. K. Prizenko and A. P. Ryskov. Genetic variability and passportization of wild carp and Russian common carp breeds *Cyprinus carpio*. Book of Abstracts, International Conference "World Aquaculture 2005", Bali, Indonesia, May 9-13, 2005, p.87.
8. Semyenova S.K., **Ludanny R.I.**, Chrisanfova G.G., Slysko Y. V., Yakovlev V.N., Ryskov A.P. Genome variability of common bream (*Abramis brama*), roach (*Rutilus rutilus*) and their F1 hybrids. Symposium on Hybridization in Animals – Extent, Processes and Evolutionary impact. Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt- an -Main, Germany, 2005, October 12-15, p.38.
9. Луданный Р.И., Хрисанфова Г.Г., Столбунова В.В., Слышко Ю.В., Рысков А.П., Семенова С.К. Митогеномика пресноводных рыб семейства карповых (Cyprinidae). Рабочее совещание «Штрих-кодирование видов рыб в России на основе ДНК. Интеграция в глобальную программу Fish-BOL». ИБМ РАН, Владивосток, Россия. 12-15 июня 2007, с.5.
10. **Ludanny R.**, Chrisanfova G., Stolbunova V., Slysko Y., Semyenova S. Comparative mitogenomic study of some Cyprinidae species (common carp, bream and roach). Book of Abstracts, European Congress of Ichthyology – ECI XII, Cavtat, Dubrovnik, Croatia. 9-13 September 2007, p. 37.
11. Луданный Р. И., Торгунакова О. А., Хрисанфова Г. Г., Егорова Т. А., Семенова С. К. Молекулярная филогения карповых рыб на основе кодирующего и некодирующего участков митохондриального генома. Сборник тезисов 12-ой Международной пушинской школы -конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино 2008, с.59.



Подписано в печать 20.11.2008 г.

Печать трафаретная

Заказ № 1276

Тираж: 100 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru