

Б. М. МЕДНИКОВ, А.-Д. Г. АХУНДОВ

**СИСТЕМАТИКА РОДА БЛАГОРОДНЫХ ЛОСОСЕЙ SALMO
(PISCES, SALMONIDAE) В СВЕТЕ ДАННЫХ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ГИБРИДИЗАЦИИ ДНК**

(Представлено академиком А. С. Спириным 13 II 1975)

Ставшая классической методика молекулярной гибридизации ⁽¹⁾, особенно при фиксации ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах ⁽²⁾, с успехом применяется для решения спорных проблем систематики ⁽³⁻⁵⁾. Однако она малоприменима при изучении ДНК близких видов и внутривидовых форм, так как различия в проценте гибридизации суммарной ДНК в данном случае сравнимы с ошибкой определения.

Известно, однако, что ДНК содержит участки повторяющихся последовательностей, эволюционирующие с большой скоростью и потому различные для близких видов. Таковы транскрибируемые и нетранскрибируемые «спейсеры» рДНК *Xenopus* ⁽⁶⁾, «сателлитные» ДНК млекопитающих ⁽⁷⁾. Гибридизация ДНК — ДНК и ДНК — РНК этих фракций была бы весьма ценным методом микросистематики. Однако широкому применению подобных модификаций препятствует трудоемкость фракционирования ДНК.

Более перспективен иной путь: гибридизация суммарной ДНК с последующим термическим фракционированием гибридных комплексов. Показано ^(8, 9), что таким способом можно выделить ДНК, реассоциирующую с образованием термостабильных комплексов, элюирующихся с гидроксипапатита лишь при температуре выше 70°. Кривая элюции бимодальна: фракция, элюирующая при высокой температуре, названа «видоспецифичной», так как у грызунов в пределах вида она идентична (подвиды различаются лишь по ее количеству) и различна у представителей разных родов ⁽⁸⁾.

Исходя из этого, мы разработали модификацию метода молекулярной гибридизации ДНК — ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах, позволяющую удовлетворительно дискриминировать не только близкие виды одного рода, но и подвидовые категории, такие как жилые и проходные формы лососевых рыб.

Исследовали ДНК представителей рода *Salmo* (благородные лососи, сем. Salmonidae): 1) *S. gairdneri* Richardson — популяция интродуцированная из штата Орегон, США; 2) *S. irideus* Gibbons (Гудауты, Чернореченское форелевое хозяйство); 3) *S. penshinensis* Pallas (западное побережье Камчатки); 4) *S. mykiss* Walbaum (западное побережье Камчатки); 5) *S. salar* L. — формы «листопадка» и осенняя, Мурман; 6) *S. trutta* L. — проходная форма, Мурман.

Выделение ДНК, мечение ³H и гибридизацию проводили по уже описанной методике ^(1, 5). В качестве эталонной ДНК использовали меченую фрагментированную ДНК стальноголового лосося *S. gairdneri*. После отмывки стандартным солевым раствором (0,15 M NaCl, 0,015 M Na-нитрат, 0,1 M этилендиаминтетрауксусная кислота, pH 8 при 60°) фильтры с гибридными комплексами инкубировали в том же растворе в пробирках или флаконах для сцинтилляционного счета, помещенных в градиентный политермостат в интервале от 60 до 90° (в ряде параллелей от 65 до 85°). После 1–2 час. инкубации фильтры вынимали, высушивали и измеряли

активность на счетчике «Marc» в толуольном сцинтиллаторе. Аликвоты растворов, в которых инкубировались фильтры, выпаривали до 1 мл в вакуумном сушильном шкафу с последующим измерением активности в диоксановом сцинтиллаторе. В ряде параллелей осаждали ДНК равным объемом 10% трихлоруксусной кислоты с альбумином в качестве носителя, высаживали на нитроцеллюлозные фильтры марки VUFS (Чехословакия) для измерения в толуольном сцинтиллаторе.

Кривые термостабильности гибридных комплексов во всех случаях одинаковы (рис. 1). При всех вариантах гибридизации выделяются 2 фракции 1) несовершенные комплексы, денатурирующиеся в интервале 60–75°, количество которых в пределах ошибки опыта идентично у всех видов; 2) совершенные комплексы, образуемые ДНК, по-видимому, с большим количеством повторов, аналогичные «видоспецифичной» ДНК по терминологии Райс^(8, 9), денатурирующиеся выше 75° и составляющие около 30% всех гибридных последовательностей. Эта фракция в ряде случаев также выглядит неоднородной (кривая термостабильности бимодальна). Быть может, этот факт свидетельствует в пользу гипотезы об аллотетраплоидности семейства лососевых⁽¹⁰⁾.

В следующей серии опытов исследовали близость предателителей рода *Salmo* к стальноголового лосося по проценту гибридизации во фракции 2. Для этой цели комплексы, входящие во фракцию 1, элюировались с фильтров двухчасовой инкубацией при 75°. Промытые в той же среде и при той же температуре фильтры просушивались и переносились в толуольный сцинтиллатор. Результаты показаны в табл. 1.

В настоящее время считается доказанным, что радужная форель *S. irideus* представляет собой жилую форму *S. gairdneri*; имеются также убедительные доводы в пользу того, что *S. penshinensis* и *S. mykiss* — проходная и жилая форма единого вида⁽¹¹⁾. Есть указания⁽¹¹⁾ о чрезвычайной близости, если не идентичности, камчатских и американских благородных лососей. Наши данные свидетельствуют об этой идентичности: в северной Пацифике как по американскому, так и по азиатскому берегу обитает один вид, образующий жилые формы, прежде именовавшиеся *S. irideus* и *S. mykiss*. Процесс образования жилых форм сопровождается значительным снижением в геноме доли фракции 2. Согласно правилу приоритета, этот вид должен носить название *Salmo mykiss* Walbaum 1792. О других аме-

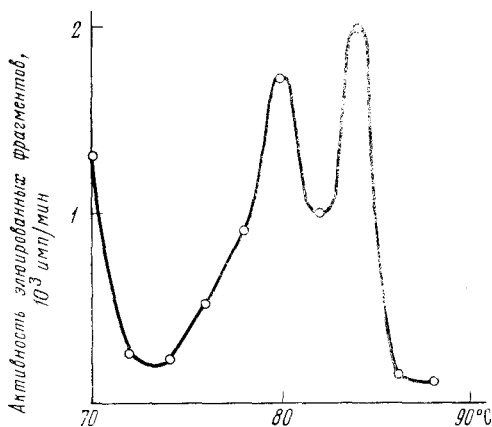


Рис. 1. Термостабильность гибридных комплексов ДНК кумжа и стальноголового лосося

Таблица 1

Вид	Гибри- диза- ция фракции 2, %	Вид	Гибри- диза- ция фракции 2, %
<i>S. gairdneri</i> (стальноголовый лосось)	100±3,0	<i>S. trutta</i> (кумжа)	25,5±3,5
<i>S. penshinensis</i> (камчатская семга)	102±3,1	<i>S. salar</i> (семга-листопадка)	13±1,6
<i>S. mykiss</i> (мукля)	82±3,0	<i>S. salar</i> (семга осенняя)	15±1,5
<i>S. irideus</i> (радужная форель)	61±4,3		

риканских видах, близких к микиже и объединяемых в подрод *Parasalmo*, мы не можем сейчас ничего сказать из-за отсутствия материала. Фракция 2 не может считаться «видоспецифичной»⁽⁸⁾, так как обнаруживается у самостоятельных, хотя и весьма близких видов — атлантической семги и кумжи. Наиболее удалена от эталонного вида атлантическая семга, что хорошо согласуется с морфологическими и кариологическими данными. В целом результаты наших опытов подтверждают мнение^(11, 12) о разделении рода *Salmo* на три группы: группа «*mykiss*» (микижа и близкие американские виды), монотипичная группа «*salar*» и группа «*trutta*» (кумжа и, очевидно, севанские форели).

Характеристика свойств и изучение функций ДНК фракции 2, образующей термостабильные гибридные комплексы, будет темой нашей следующей работы. Предлагаемый в данной статье метод, как нам кажется, может стать весьма действенным орудием микросистематика при изучении внутривидовой изменчивости и родственных взаимоотношений близких видов.

В заключение выражаем глубокую признательность К. А. Савантовой и В. А. Максимова за предоставление материала по камчатским лососям.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
24 XII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ B. H. Hoyer, B. J. McCarthy, E. T. Bolton, *Science*, v. 144, 959 (1964). ² D. T. Denhardt, *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 23, 5, 641 (1966). ³ Сб.: Стресс и ДНК и положение организмов в системе, М., 1972. ⁴ Л. С. Попов, А. С. Антонов и др., ДАН, т. 211, № 3, 737 (1973). ⁵ Б. М. Медников, А. С. Антонов, ДАН, т. 218, № 6, 1485 (1974). ⁶ D. D. Brown, P. C. Wensink, P. E. Jordan, *J. Mol. Biol.*, v. 63, 1, 57 (1972). ⁷ J. A. Mazrimas, F. T. Hatch, *Nature New Biol.*, v. 240, 102 (1972). ⁸ N. R. Rice, In: *Evolution of Genetic Systems*, N. Y., 1972. ⁹ N. R. Rice, N. A. Straus, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 70, 12, 3546 (1973). ¹⁰ E. J. Massaro, C. L. Markert, *J. Exp. Zool.*, v. 168, 2, 223 (1968). ¹¹ К. А. Саввантова, В. А. Максимов и др., Камчатские благородные лососи, Воронеж, Изд-во ВГУ, 1973. ¹² Е. А. Дорофеева, Тез. докл. I Европейск. ихтиол. конгр., 1973, стр. 37.