

На правах рукописи

КОРДИЧЕВА

Светлана Юрьевна

**Нуль-аллели в микросателлитных локусах кеты
(*Oncorhynchus keta* Walbaum).**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории генетических проблем идентификации Учреждения Российской академии наук Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, г. Москва.

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор

Животовский Лев Анатольевич
Учреждение Российской академии наук
Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова
РАН, Москва

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук,
профессор

Сулимова Галина Ефимовна
Учреждение Российской академии наук
Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова
РАН, Москва

кандидат биологических наук
доцент

Строганов Андрей Николаевич
Московский государственный университет
им. Ломоносова, Биологический факультет,
г. Москва

Ведущее учреждение:

Всероссийский научно-исследовательский
институт рыбного хозяйства и океанографии,
г. Москва

Защита состоится «28» апреля 2011 года в «14-00» часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 при Учреждении Российской академии наук Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3.
Факс: 8(499) 132-89-62, электронный адрес: aspirantura@vigg.ru, адрес в интернете: www.vigg.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан «28» марта 2011 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.А. Синельщикова

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы.

Тихоокеанский лосось - кета (*Oncorhynchus keta* Walbaum), имеет большое промысловое значение и является важным элементом продовольственной безопасности России. Изучение генетического состава популяций кеты важно не только для решения фундаментальных научных проблем, например, такой как популяционная организация вида, но и для формирования представления о том, как лучше сохранять, воспроизводить этот вид, а так же оптимизировать процессы рыбоводства и рыболовства. Актуальным вопросом на данный момент является изучение популяционной структуры разных видов с помощью микросателлитных маркеров. Микросателлиты обладают высоким полиморфизмом и хорошо дифференцируют популяции (Schlotterer С., 1998; Животовский Л.А., 2006). На данный момент уже проведены большие исследования по микросателлитной изменчивости кеты и показано, что они являются хорошими маркерами для исследования межпопуляционных различий этого вида (Brown, Epifanio 2003; Афанасьев и др., 2008; Животовский и др. 2008). Однако, при проведении широкомасштабных популяционных исследований на разных видах животных, исследователи сталкиваются с проблемой нуль-аллелей. В популяционных исследованиях нуль-аллелем принято называть явление отсутствия ПЦР-продукта, которое вызвано мутациями (единичная замена, инсерция, делеция, инверсия) во фланкирующих микросателлит последовательностях ДНК, на которую гибридизуются праймеры. Это приводит к некорректной интерпретации популяционных данных, создавая «фальшивые» гомозиготы вместо гетерозигот и увеличивая тем самым уровень наблюдаемой гомозиготности, что тестируется отклонением от равновесия Харди-Вайнберга (Carlsson, 2008). Следует заметить, что нуль-аллели встречались и в исследованиях полиморфизма аллозимных маркеров, где они проявлялись отсутствием ферментативной активности, и могут встретиться при исследованиях иных типов полиморфизма ДНК. Так что наличие нуль-аллелей приводит к появлению проблем скрытого полиморфизма в виде «фальшивой» гомозиготности, возникающей в популяционных исследованиях, как фундаментального, так и прикладного характеров.

Так как ещё не разработаны надежные способы определения и учета данного явления, во многих популяционных исследованиях те локусы, в которых предположительно выявляются нуль-аллели, исключаются из популяционного анализа (Senn H, Pemberton J., 2009; Zhan A., Hu J., Hu X. et al. 2009). Однако, такой путь решения проблемы этого явления неприемлем при масштабных исследованиях, поскольку при увеличении самой выборки или расширении исследуемых популяций, возрастает вероятность появления нуль-аллеля на каждый локус, что может привести к исключению большого числа локусов из популяционного анализа, а это отрицательно сказывается на качестве исследований. Причем, у одного вида в одной популяции нуль-аллели могут присутствовать, а в другой популяции - нет. Кроме того, важно знать какие именно мутации приводят к появлению нуль-аллелей. Данную задачу можно решить через исследование нуклеотидной последовательности ДНК праймерной области.

Чтобы подробно изучить указанное явление, мы выбрали объект, достаточно хорошо изученный на большой части ареала по микросателлитным локусам – кету, которая уже подробно охарактеризована по набору из десяти микросателлитных маркеров (Афанасьев и др. 2008; Животовский и др. 2008; Рубцова и др. 2008; Шитова и др. 2009). Одним из локусов, попадающим под «подозрение» на наличие в нем нуль-аллеля при крупномасштабном исследовании популяций кеты, является *Oke3* (Buchholz W.G., et al., 2001). По этому локусу были выявлены достоверные отклонения от равновесия Харди-Вайнберга в сторону увеличения гомозигот в ряде выборок кеты островов Сахалин, Кунашир и Итуруп.

Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга может появляться по разным причинам: отбор, действующий на данный локус, инбридинг, смесь нескольких популяций, в которых отличаются частоты аллелей, или наличие нуль-аллеля. Гипотеза о действующем на этот

локус отборе была отвергнута, так как микросателлитные локусы считаются селективно нейтральными. Возможность инбридинга исключается, иначе отклонения от равновесия Харди-Вайнберга наблюдались бы по всем исследуемым локусам. Гипотеза смешения популяций (эффект Валунда) нами была поставлена под сомнение в подавляющем большинстве случаев, так как в исследованных ранее популяциях кеты наблюдались слишком сильные отклонения от равновесия Харди-Вайнберга, чтобы объяснять имеющуюся относительно невысокую локальную генетическую дифференциацию кеты. Поэтому, мы остановились на гипотезе о наличии нуль-аллелей в локусе *Oke3* и в связи с этим, были поставлены следующие цели и задачи исследования.

Цели и задачи исследования.

Цель работы: выявить нуль-аллели в микросателлитном локусе *Oke3* в популяциях кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum), изучить первичную структуру этих аллелей и исследовать их географическое распространение.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать праймеры, с помощью которых можно добиться амплификации нуль-аллелей в микросателлитном локусе *Oke3*.
2. Изучить географическое распределение выявленных нуль-аллелей, а также их влияние на интерпретацию популяционных данных.
3. Локализовать мутации, которые приводят к появлению нуль-аллелей.
4. Секвенировать аллели локуса *Oke3* для его подробного структурного анализа на разных видах рыб рода *Oncorhynchus*.

Научная новизна работы.

Наибольший интерес представляет способ выявления нуль-аллелей в микросателлитном локусе и изучение их влияния на интерпретацию популяционных данных на примере различных стад кеты Дальнего Востока. Если не выявлять нуль-аллели, то наблюдаемые различия между стадами (популяциями) могут быть, как завышены, так и занижены в зависимости от спектра скрытых аллелей: скрытые аллели снижают истинную дифференциацию между популяциями в случаях, когда в разных регионах встречаются разные нуль-аллели и завышают, когда они одинаковы.

При помощи секвенирования нуклеотидной последовательности локуса *Oke3* кеты были выявлены мутации, приводящие к появлению нуль-аллелей. Проведено секвенирование и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей разных видов рыб рода *Oncorhynchus* по локусу *Oke3*.

Выявлено, что представленный локус *Oke3*, как микросателлитный, можно считать только у трех видов рода - кеты, горбуши и нерки, так как tandemные повторы встречаются только у этих видов.

Практическая значимость работы.

В ходе выполнения данной работы при изучении и добавлении полученной информации в уже существующую базу данных по микросателлитным локусам кеты обнаружено, что в 20 выборках из 25, в которых ранее было выявлено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга по локусу *Oke3*, вызванное ложной гомозиготностью из-за наличия нуль-аллелей, оно не наблюдалось при использовании альтернативных праймеров. Предложенный метод позволил выявить весь спектр аллельного разнообразия, ранее «скрытого» за нуль-аллелями. Это позволило получить несмещённые оценки степени дифференциации популяций кеты.

При помощи секвенирования нуклеотидной последовательности локуса *Oke3* кеты были выявлены мутации, приводящие к появлению нуль-аллелей. Эти мутации в дальнейшем

можно учитывать не только для подбора праймеров к данному локусу, но и в качестве дополнительных маркеров при популяционных исследованиях кеты.

В результате, перед проведением популяционных исследований различных видов по одним и тем же микросателлитным локусам, желательно предварительно изучить их нуклеотидную последовательность для уточнения микросателлитного статуса данного локуса.

Апробация результатов работы: Материалы, вошедшие в диссертационную работу, были представлены на Научном семинаре «Популяционная и эволюционная генетика» (Москва, 2010), Международной конференции «Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб» (г. Санкт-Петербург, 2010), Международной конференции "Проблемы экологии: чтения памяти профессора М.М. Кожова" (г. Иркутск 2010), Четвертой международной школе молодых ученых по генетике "Геномика и биология клетки": (Звенигород, 2010).

Публикации: По теме диссертации опубликовано трое тезисов в сборниках отечественных конференций и одна научная статья в журнале, рекомендованном ВАК.

Участие автора в получении результатов исследования: Диссертация написана автором лично с использованием собственных результатов, а также результатов, полученных ранее в совместных экспериментах в лаборатории генетических проблем идентификации ИОГен РАН им. Н. И. Вавилова. Процент личного участия в экспериментальных исследованиях составил не менее 90%.

Объем и структура диссертации: Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и включает 13 таблиц, 6 рисунков и 6 приложений. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 135 цитированных источников, из которых 110 на иностранных языках.

Автор выражает искреннюю благодарность: Л.А. Животовскому за организацию данного исследования, научную дискуссию, и ценные советы; К.И. Афанасьеву, Г.А. Рубцовой, М.В. Шитовой за наставления в освоении методов и проведении эксперимента; К.И. Афанасьеву, Г.А. Рубцовой, М.В. Шитовой и Л.А. Животовскому за предоставленные по естественным и заводским популяциям кеты Дальнего Востока; Т.В. Малининой, П.К. Афанасьеву, Т.В. Ракицкой, В.Д. Прохоровской за моральную поддержку; Е.Г. Шайхаеву за помощь в освоении программ и подбор праймеров; коллективам рыбоводных заводов Дальнего Востока за предоставленную возможность сбора биологических образцов; всем сотрудникам лаборатории генетических проблем идентификации за творческую и стимулирующую атмосферу.

Основное содержание работы

ГЛАВА 2. Обзор литературы

Настоящая глава подготовлена по литературным данным и состоит из двух разделов.

В первом разделе приводится краткое описание биологии кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) и её хозяйственное значение.

Во втором разделе приводится описание различных ДНК маркеров. Подробное описание тандемных повторов их особенностей и недостатков. Описаны проблемы возникающие при использовании микросателлитных локусов в качестве маркеров для различных популяционных исследований, в виде появления нуль-аллелей и представлены возможные варианты решения данного вопроса.

ГЛАВА 3. Материалы и методы.

Характеристика исследуемых проб.

Пробы кеты.

Для выявления и подробного исследования нуль-аллелей в микросателлитном локусе *Oke3* были взяты образцы ткани производителей кеты из 66 выборок разных регионов, взятых во время нерестового хода, как с естественных нерестилищ, так и с лососевых рыбоводных заводов (ЛРЗ) (Афанасьев и др. 2008.) Список всех выборок представлен в таблице 1.

Молекулярно-генетическая методика анализа.

Для изучения ДНК-маркеров от каждой рыбы брали образец печени (выборки 2003, 2004гг.) или край плавника (выборки 2005-2007гг.). Полученные образцы фиксировали в 96%-м растворе этанола. Ранее в лаборатории во всех выборках, кроме выборок из Приморского края и США, уже была сделана работа по определению генотипа исследуемых рыб по локусу *Oke3* и выявлены гомозиготные особи. Из 57 выборок, изученных ранее в лаборатории, в 23 наблюдалось сильное отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, в сторону увеличения гомозигот. Поэтому в данной работе изучались уже только те образцы, которые при анализе микросателлитного локуса *Oke3* вели себя как гомозиготы. А в семи выборках из Приморского края и двух выборках из США (213 и 98 образцов соответственно) сначала были определены генотипы всех рыб по локусу при помощи оригинальных праймеров к локусу *Oke3*, и только после этого для исследования отобраны те образцы, которые являлись гомозиготами по данному локусу. В итоге в исследовании были изучены 932 особи из разных регионов, имеющие гомозиготный генотип по локусу *Oke3*. В таблице 1 приведены данные по количеству исследуемых в нашей работе гомозигот в каждой выборке.

Таблица 1. Места и даты взятия выборок производителей кеты.

| № | Место взятия выборки | Дата выборки | Число рыб в выборке | Число исследуемых гомозигот |
|----|----------------------------|--------------|---------------------|-----------------------------|
| | О.Сахалин: | | | |
| 1 | Адо-Тымовский ЛРЗ | 04.09.2003 | 51 | 14 |
| 2 | Адо-Тымовский ЛРЗ | 17.09.2004 | 50 | 18 |
| 3 | Калининский ЛРЗ | 30.08.2003 | 50 | 14 |
| 4 | Калининский ЛРЗ | 08.09.2004 | 50 | 7 |
| 5 | Таранайский ЛРЗ | 16.09.2003 | 50 | 10 |
| 6 | Таранайский ЛРЗ | 23.09.2004 | 50 | 14 |
| 7 | Ударница (Охотский ЛРЗ) | 15.09.2003 | 50 | 16 |
| 8 | Ударница (Охотский ЛРЗ) | 24.09.2004 | 50 | 20 |
| 9 | Ударница (Охотский ЛРЗ) | 05.10.2005 | 50 | 9 |
| 10 | Б.Такой (Соколовский ЛРЗ) | 11.09.2003 | 50 | 9 |
| 11 | р. Белая (Соколовский ЛРЗ) | 13.09.2004 | 50 | 12 |
| 12 | р.Найба, устье | 20.09.2004 | 50 | 13 |
| 13 | Сокольниковский ЛРЗ | 14.09.2004 | 50 | 11 |
| 14 | р. Ай | 03.10.2005 | 17 | 4 |
| 15 | Буюклинский ЛРЗ | 24.09.2005 | 50 | 19 |
| 16 | ЛРЗ Монетка | 29.09.2005 | 50 | 17 |
| 17 | Побединский ЛРЗ | 24.09.2005 | 50 | 13 |
| 18 | Ясноморский ЛРЗ | 30.09.2005 | 50 | 16 |
| | О.Итуруп: | | | |
| 19 | оз. Сопочное | 06.10.2004 | 50 | 9 |
| 20 | оз. Сопочное | 13.11.2005 | 50 | 22 |
| 21 | оз. Сопочное (устье) | 21.10.2005 | 50 | 18 |
| 22 | оз. Сопочное | 26.10.2007 | 50 | 16 |
| 23 | оз. Сопочное(протока) | 26.10.2007 | 50 | 29 |
| 24 | руч. Порожистый | 13.11.2005 | 50 | 17 |
| 25 | руч. Порожистый | 24.10.2006 | 50 | 23 |
| 26 | Рейдовский ЛРЗ | 11.10.2004 | 50 | 14 |

| | | | | |
|----|-------------------------------------|------------|------|-----|
| 27 | Рейдовский ЛРЗ, выборка 1 | 14.10.2005 | 50 | 19 |
| 28 | Рейдовский ЛРЗ, выборка 2 | 19.10.2005 | 50 | 6 |
| 29 | Рейдовский ЛРЗ, выборка 3 | 26.10.2005 | 50 | 17 |
| 30 | р. Рыбацкая | 08.10.2004 | 50 | 22 |
| 31 | р. Рыбацкая | 23.10.2005 | 50 | 19 |
| 32 | Кетовый (Курильский ЛРЗ) | 12.10.2004 | 51 | 22 |
| 33 | Кетовый, выборка 1 (Курильский ЛРЗ) | 06.10.2005 | 50 | 15 |
| 34 | Кетовый, выборка 2 (Курильский ЛРЗ) | 17.10.2005 | 50 | 16 |
| 35 | Кетовый, выборка 3 (Курильский ЛРЗ) | 26.10.2005 | 50 | 14 |
| 36 | оз. Куйбышевское | 13.10.2004 | 50 | 13 |
| 37 | оз. Куйбышевское | 24.10.2006 | 50 | 23 |
| 38 | оз. Куйбышевское | 14.10.2007 | 50 | 8 |
| 39 | оз. Благодатное | 11.10.2005 | 50 | 16 |
| 40 | оз. Благодатное | 13.10.2007 | 50 | 18 |
| 41 | оз. Лебединое | 08.11.2007 | 50 | 12 |
| | О.Кунашир | | | |
| 42 | р. Ильюшина | 12.10.2005 | 50 | 25 |
| 43 | р. Серноводка | 13.10.2005 | 50 | 20 |
| | Приморский край | | | |
| 44 | р. Нарва | 1995 | 51 | 11 |
| 45 | р. Нарва | 2005 | 20 | 8 |
| 46 | р. Нарва | 2006 | 42 | 9 |
| 47 | р. Нарва | 2007 | 51 | 13 |
| 48 | р. Киевка | 2002 | 12 | 6 |
| 49 | р. Киевка | 2003 | 11 | 4 |
| 50 | р. Авакумовка | 1994 | 26 | 7 |
| | Магаданская область | | | |
| 51 | р. Яна, выборка 1 | 18.07.2007 | 17 | 2 |
| 52 | р. Яна, выборка 2 | 18.08.2007 | 31 | 7 |
| 53 | р. Яма(молодь) | 2007 | 50 | 24 |
| 54 | р. Кулькуты | 08.09.2007 | 50 | 13 |
| 55 | р. Кулькуты (молодь) | 2007 | 50 | 19 |
| | Чукотский Автономный Округ | | | |
| 56 | Анадырь, выборка 1 | 20.08.2007 | 50 | 14 |
| 57 | Анадырь, выборка 2 | 11.08.2007 | 50 | 17 |
| 58 | Анадырь, выборка 3 | 04.09.2007 | 50 | 19 |
| | Камчатский край | | | |
| 59 | р. Камчатка | 26.07.2007 | 50 | 12 |
| 60 | р. Налычева | 08.08.2007 | 16 | 5 |
| 61 | р. Паратунка | 07.08.2007 | 50 | 16 |
| 62 | р. Авача | 02.08.2007 | 50 | 13 |
| 63 | р. Большая | 09.08.2007 | 50 | 13 |
| 64 | р. Быстрая | 04.08.2007 | 14 | 4 |
| | США | | | |
| 65 | Teslin | 2004 | 48 | 16 |
| 66 | Snake | 2004 | 48 | 11 |
| | Итого: | | 3006 | 932 |



Рис.1. Места взятия проб. В скобках указано количество выборок с данного региона.

Другие виды рыб рода *Oncorhynchus*.

Для подробного и сравнительного изучения структуры микросателлитного локуса *Oke3*, мы исследовали по 5 образцов рыб рода *Oncorhynchus*: горбуша (*O. Gorbuscha* Walbaum), нерка (*O. nerka* Walbaum), чавыча (*O. tshawytscha* Walbaum), кижуч (*O. kisutch* Walbaum) и сима (*O. masou* Brevoort).

Пробы горбуши были собраны на о. Итуруп, в устье реки Курилка в 2007 году. Образцы нерки, микижи, кижуча и чавычи собирались на п-ве Камчатка, на биостанции «Радуга» из реки Камчатка в 2008 году. Пробы симы были взяты от рыб, выловленных в реке Знаменка, острова Сахалин в 2008 году. Также как и у кеты, для исследования ДНК от рыб отрезали кусочек плавника и фиксировали в 96%-м растворе этанола. Далее в лаборатории в Москве проводили все необходимые биотехнологические манипуляции.

Методика исследования микросателлитного локуса *Oke3*.

Тотальную ДНК выделяли по стандартной методике с помощью набора реактивов «Diatom DNA Prep 200» ООО «Лаборатория Изоген». Концентрацию ДНК определяли по интенсивности свечения в УФ-свете в сравнении с интенсивностью свечения ДНК фага λ с уже известной концентрацией. Для определения генотипа по локусу *Oke3* изначально использовались праймеры синтезированные согласно опубликованным данным (Buchholz W.G 2001), далее называемые «оригинальные праймеры». Так как последовательность локуса *Oke3* известна и находится в открытом доступе в National Center for Biotechnology Information database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/13241991>, NSBI), то для поиска нуль-аллелей к фланкирующим участкам были подобраны различные варианты праймеров, далее называемые "альтернативными праймерами", представленные в таблице 2. Все праймеры были синтезированы ЗАО «Синтол» (Россия). Для выявления нуль-аллелей были поставлены

ПЦР с каждой парой альтернативных праймеров, на тех образцах, у которых наблюдался гомозиготный генотип по микросателлитному локусу *Oke3*.

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали набор реагентов для амплификации ДНК «GenePak PCR Core» ООО «Лаборатория Изоген», содержащий ингибированную для «горячего старта» Taq ДНК полимеразу, дезоксинуклеозид трифосфаты и хлорид магния с конечными концентрациями, соответственно, 1ц, 200 мкМ и 2,5 мМ, а также оптимизированную буферную систему для проведения ПЦР. Конечная концентрация праймеров в реакции 0,1-0,5 мкМ, количество ДНК 50-100 нг. Амплификацию микросателлитного локуса *Oke3* проводили в термоциклере «Applied Biosystems 9800 Fast Thermal Cycler» при следующем режиме: предварительная денатурация ДНК: 95°C – 5 мин; 8 циклов: плавление 94°C – 1мин, отжиг праймеров, синтезированных согласно опубликованным данным проходил при температуре - 54°C – 30с, отжиг альтернативных праймеров, при температуре -X°C – 30с (Таблица 2), синтез ДНК - 72°C – 30с; затем следовал 21 цикл, включающий: плавление 94°C – 30с, отжиг праймеров, синтезированных согласно опубликованным данным - 54°C, и отжиг альтернативных праймеров - X°C – 30с, синтез ДНК - 72°C – 15с.

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6 %-ном неденатурирующем полиакриламидном геле в 0,5× ТБЕ-буфере (трис-ЭДТА-боратная система), рН 8,0 (Маниатис и др., 1984) при напряжении 300В в течение 2,5 ч. Гель окрашивали бромистым этидием 5 мкг/мл в течение 10 минут и фотографировали в УФ-свете на ультрахемископе. В качестве маркеров длины фрагментов использовали ДНК плазмиды *pBR322*, обработанную рестриктазой *HaeIII*. Размеры аллелей определяли с использованием программы 1D Image Analysis Software Version 3,5 фирмы «Кодак».

Таблица 2. Последовательности праймеров, подобранные к локусу *Oke3* для поиска нуль-аллелей.

| № | Прямые праймеры | X - t отжига °C |
|---------------------|--|--------------------|
| 1 (1890) | 5'-GGATCTGGGCATGTTATCAC-3' | 58 |
| 2 (1891) | 5'-GGGCATGTTATCACTTTCAGACA-3' | 56 |
| 3 (1892) | 5'-CAGACACCACAGCAGTATG-3' | 56 |
| 4 (1893) | 5'-GCAGTATGCCCTACCTGAGAT-3' | 56 |
| 5 (1894) | 5'-GCCCTACCTGAGATTCAAAC-3' | 56 |
| 6 (1895) | 5'-CTCTCTGAACAСТАCTСТАТСТ-3' | 56 |
| 7 (1896) | 5'-СТАСТСТАТСТССТАСАССАСТТТА-3' | 56 |
| 8 (1897) | 5'-ССАСТТТАГГСАТСГАГСТАААСА-3' | 56 |
| 9 (<i>Oke3</i>) | 5'-ACCCTGAGAGCAATCAAC-3' | 52 |
| 10 (<i>Oke3</i> G) | 5'-CTCTTGTTCTTTCTCACTTTACACTTT-3' | 56 |
| 11 (<i>Oke3</i> L) | 5'-GGATCTGGGCATGTTATCACTTTCAGACACCACA-3' | 54 |
| 12 (<i>Oke3</i> S) | 5'-ATCTGGGCATGTATCACTTT-3' | 56 |
| | Обратные праймеры | |
| 13 (1898) | 5'-GAGATAAGAGAGAAAACAAGGATCA-3' | 56 |
| 14 (1899) | 5'-GGATCAGGGATATGCAGTAAATAGTA-3' | 56 |
| 15 (1900) | 5'-GGGATATGCAGTAAATAGTAGTGTTTAG-3' | 56 |
| 16 (1901) | 5'-GTAGTGTTTAGACATTTGTGAAAATAGATATC-3' | 56 |
| 17 (1902) | 5'-CACCACAACCCCTGTGTTTCA-3' | 56 |
| 18 (1903) | 5'-CTGTGTTTCAGGGGGTTGA-3' | 56 |
| 19 (1904) | 5'-GGGGTTGAGAGAGAGAGAAAAG-3' | 56 |
| 20 (1905) | 5'-GAGAGAGAAAGAGCGAAGGAGA-3' | 56 |

| | | |
|---------------|--|----|
| 21 (Oke3) | 5'-TCAGGGATATGCAGTAAATAGTA-3' | 52 |
| 22 (Oke3 G) | 5'-CAGGGATATGCAGTAAATAGTAGTGTTTA-3' | 56 |
| 23 (Oke3 L) | 5'-GAGATAAGAGAGAGAGAAAACAAGGATCAGGATATGCAGTAA-3' | 56 |
| 24 (Oke3 JR) | 5'-GAGATAAGAGAGAGAGAAAACAAG-3' | 56 |
| 25 (1898-L R) | 5'-GAGATAAGAGAGAGAGAAAAC-3' | 56 |
| 26 (Oke3 S) | 5'-GAGATAAGAGAGAGAGAAA-3' | 56 |
| | | |

Секвенирование локуса *Oke3*.

Для детального изучения структуры микросателлитного локуса *Oke3* и его фланкирующих участков были изучены образцы ДНК разных видов рыб рода *Oncorhynchus* при помощи секвенирования. Секвенирование и очистку ПЦР продукта осуществляла ЗАО «Евроген» (Россия). Для максимального охвата нуклеотидной последовательности всего локуса у всех видов мы старались подобрать праймеры, которые лежат в самых крайних известных фланкирующих участках. Предварительную амплификацию микросателлитного локуса *Oke3* для секвенирования проводили в термоциклере «Applied Biosystems 9800 Fast Thermal Cycler» при использовании набора реагентов для амплификации ДНК «GenePak PCR Core» ООО «Лаборатория Изоген», при следующем режиме: денатурация ДНК: 94°C – 30 с; отжиг праймеров - 60°C – 30с, синтез ДНК - 72°C – 30с. Номер используемых (таблица 2) праймеров и температура их отжига для каждого вида, указаны в таблице 3. Для постановки одной реакции секвенирования объем реакционной смеси составлял не менее 8 мкл раствора. Конечная концентрация ПЦР продукта, требуемая для секвенирования составляла 40-50 нг/мкл.

Таблица 3. Используемые праймеры и температуры их отжигов для секвенирования локуса *Oke3* на разных видах.

| вид | кета | горбуша | нерка | сима | микижа | чавыча | кижуч |
|-------------------------|-------|---------|-------|-------|--------|--------|-------|
| № праймеров (таблица 1) | 1, 13 | 1, 13 | 1, 24 | 1, 24 | 1, 24 | 1, 24 | 1, 24 |
| t отжига °C | 59-60 | 61 | 60 | 60 | 60 | 60 | 58 |

Для обработки полученных секвенированных последовательностей локуса *Oke3* использовались пакеты программ «Lasergene» и «SeqMan Ngen», предоставленные биоинформационной кампанией DNASTAR (<http://www.dnastar.com>).

Статистическая обработка данных.

Статистическую обработку данных проводили согласно руководству Вейра (Вейр, 1995; Weir, 1996) при помощи программы GDA (Lewis, Zaykin, 2001). Были вычислены значения ожидаемой (H_E) и наблюдаемой (H_O) гетерозиготностей, оценки межпопуляционной дифференциации (Θ -P), индекса фиксации (f), а также проведены статистические тесты на соответствие наблюдаемых генотипических распределений равновесию Харди-Вайнберга.

Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.

Поиск нуль-аллелей.

Подбор праймеров для определения нуль-аллеля в выборке с о. Кунашир.

При широкомасштабном исследовании кеты по 10 микросателлитным локусам в одном из исследуемых локусов – *Oke3*, ранее было выявлено сильное отклонение от равновесия Харди-Вайнберга в большом количестве выборок из различных регионов Дальнего Востока. Нами было выдвинуто предположение, что причиной отклонения является наличие нуль-аллелей при постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием оригинальных праймеров. Для решения поставленной задачи нами были подобраны альтернативные праймеры к фланкирующим областям микросателлитного локуса.

Для этого были подобраны праймеры: прямой № 11 (*Oke3 G*) и обратный № 22 (*Oke3 G*) (см. главу «Методы и материалы»). После подбора условий для проведения ПЦР было решено использовать в исследовании две выборки с острова Кунашир, собранные на реках Серноводка и Илюшенка (выборки № 42, 43), так как в них наблюдалось сильное отклонение от равновесия Харди-Вайнберга по исследуемому локусу. При использовании альтернативных праймеров были исследованы все гомозиготы, ранее обнаруженные в данных выборках. В результате использования альтернативных праймеров были обнаружены истинные гетерозиготы, которые ранее, определялись как гомозиготы при использовании оригинальных праймеров. На фореграмме хорошо видны четкие гетерозиготы. Основными аллелями, обнаруживающимися как нуль-аллели были аллели №4 и №5 из 12 аллельных вариантов.

Для исключения артефактов и определения локализации мутации относительно тела микросателлита (5' или 3' фланкирующей зоны) были поставлены ПЦР для всех новообнаруженных гетерозигот с различными комбинациями оригинальных и альтернативных праймеров. В результате проведенных экспериментов не было выявлено каких-либо артефактов, а все размеры полученных ПЦР-продуктов соответствовали тому количеству нуклеотидов, на которое были смещены альтернативные праймеры (15 п. н).

После статистической обработки, проведенной с учетом полученных данных по исследуемому локусу, в двух выборках с о. Кунашир не наблюдалось отклонение от равновесия Харди-Вайнберга (Таблица 5).

Таблица 5. Результаты теста на равновесие Харди-Вайнберга в двух выборках с о. Кунашир при использовании оригинальных и альтернативных праймеров.

| Кунашир 2005г. | Число рыб в выборке | Количество Гетерозигот (оригинальные праймеры) | P 1 | Количество Гетерозигот (альтернативные праймеры) | P 2 |
|----------------|---------------------|--|--------|--|--------|
| Р. Илюшенка | 50 | 25 | 0,0001 | 37 | 0,4447 |
| Р. Серноводка | 50 | 30 | 0,0015 | 39 | 0,3987 |

P1 – тест на отклонение от равновесия Х.-В. При использовании оригинальных праймеров *Oke3*; P2 – тест на отклонение от равновесия Х.-В. при использовании альтернативных праймеров *Oke3*; Порог достоверности – $P < 0,05$.

Получив положительные результаты по определению нуль-аллелей в двух выборках с о. Кунашир, было решено исследовать все ранее обнаруженные гомозиготы, при использовании оригинальных праймеров по всем 66 выборкам из разных регионов Дальнего Востока. Однако, дальнейшее использование данных праймеров не принесло ожидаемых результатов в обнаружении нуль-аллелей в этих выборках. Обнаружены только единичные нуль-аллели, в основном на острове Сахалин, которые никак не повлияли на результаты в оставшихся 66-х выборках кеты, где по-прежнему наблюдалось отклонение от равновесия Харди-Вайнберга. Нами было высказано предположение, что на о. Кунашир выявлена специфическая мутация, вызывающая появление нуль-аллелей, характерная только для данного региона. На основании полученных результатов было решено подобрать праймеры, которые бы охватывали всю фланкирующую область микросателлитного локуса *Oke3*, позволяя исследовать его наиболее полно.

Подбор праймеров для определения нуль-аллелей в выборках с различных регионов Дальнего Востока.

Для дальнейшего обнаружения нуль-аллелей было подобрано 16 вариантов праймеров. К 5' фланкирующей зоне микросателлитного локуса подобрали праймеры с номерами – с 1-го по 8-ой, а к 3' зоне – с 13-го по 20-ый (таблица 2). Нами были использованы различные комбинации альтернативных праймеров на всех гомозиготах, обнаруженных ранее в выборке с реки Рыбацкая (2004г.), острова Итуруп в которой наблюдалось сильное отклонение от равновесия Харди-Вайнберга. В итоге, при использовании оригинальных праймеров, из 50 исследуемых образцов, 22 были идентифицированы как гомозиготы по локусу *Oke3*.

По результатам экспериментов, была подобрана пара праймеров (№8 и №20), при использовании которой из 22 исследуемых гомозигот, 14 были идентифицированы как истинные гетерозиготы. В дальнейшем было решено использовать праймеры № 8 и № 20 для исследования всех образцов, представленных ранее как гомозиготы по локусу *Oke3* из 66 выборок кеты с различных регионов Дальнего Востока.

Определение нуль-аллелей в локусе *Oke3*.

При использовании оригинальных праймеров в 66 выборках кеты из различных регионов Дальнего Востока было обнаружено 932 образца имеющих гомозиготный генотип по локусу *Oke3*. Для всех представленных гомозигот были проведены ПЦР с использованием альтернативных праймеров № 8 и № 20. В результате данного исследования были выявлены 332 истинные гетерозиготы. Для исключения артефактов и сопоставления значений молекулярного веса нуль-аллелей, обнаруженных при использовании альтернативных праймеров, с аллелями, обнаруженными при использовании оригинальных праймеров, проводились ПЦР с использованием различных комбинаций оригинальных и альтернативных праймеров. В результате проведения экспериментов было установлено соответствие размеров аллелей, с учетом смещения праймеров (58 п.н), для оригинальных и альтернативных праймеров. Также было обнаружено, что ранее обнаруженные нуль-аллели с острова Кунашир при использовании для ПЦР альтернативных праймеров №11 и 22, выявлялись и при использовании для ПЦР праймеров №8 и 20. Это свидетельствует о том, что данная пара праймеров является универсальной для выявления нуль-аллеля в нашем случае.

Результаты теста на равновесия Харди-Вайнберга в 66 выборках кеты.

Полученные данные по нуль-аллелям были внесены в наш массив данных по популяциям кеты Российского Дальнего Востока. Была проведена статистическая обработка полученных результатов, которые были получены при использовании альтернативных праймеров. Сравнение данных, полученных при использовании оригинальных и альтернативных праймеров, выявило результаты, представленные в таблицах № 6.1-6.4.

Таблица 6.1. Результаты теста на равновесие Харди-Вайнберга при использовании оригинальных и альтернативных праймеров в выборках с острова Сахалин.

| | Места взятия проб | N | исследуемых гомозигот | обнаруженных нуль-аллелей | P1 | P2 |
|--------------|-------------------|----|-----------------------|---------------------------|--------|--------|
| Сахалин 2003 | Адо-Тымово | 50 | 14 | 1 | 0,6953 | 0,4078 |
| | Калининский | 50 | 14 | 4 | 0,5965 | 0,3901 |
| | Таранай | 50 | 10 | 4 | 0,8256 | 0,9506 |
| | Ударница | 50 | 16 | 7 | 0,0403 | 0,2547 |
| | .Б.Такой | 50 | 9 | 2 | 0,6859 | 0,8656 |
| Сахалин 2004 | Адо-Тымово | 50 | 18 | 7 | 0,0006 | 0,0053 |
| | р.Найба | 50 | 13 | 8 | 0,0059 | 0,0951 |
| | Калининский | 50 | 7 | 1 | 0,3144 | 0,4325 |

| | | | | | | |
|--------------|-------------|----|----|----|--------|--------|
| | Таранай | 50 | 14 | 4 | 0,1669 | 0,5425 |
| | Ударница | 50 | 20 | 13 | 0,0001 | 0,2437 |
| | р.Белое | 50 | 12 | 6 | 0,1431 | 0,2197 |
| | Сокол | 50 | 11 | 1 | 0,5409 | 0,6271 |
| | р.Ай | 17 | 4 | 0 | 0,8937 | 0,8937 |
| Сахалин 2005 | Буюклы | 50 | 19 | 7 | 0,0159 | 0,5565 |
| | Монетка | 50 | 17 | 4 | 0,4456 | 0,6181 |
| | Ударница | 50 | 9 | 5 | 0,0593 | 0,1062 |
| | Победино | 50 | 13 | 5 | 0,0675 | 0,2631 |
| | Ясноморский | 50 | 16 | 1 | 0,3306 | 0,3734 |

P1 – тест на отклонение от равновесия Х.-В. при использовании оригинальных праймеров *Oke3*; P2 – отклонение от равновесия Х.-В. при использовании альтернативных праймеров *Oke3*; порог достоверности – $P < 0,05$.

Таблица 6.2. Результаты теста на равновесие Харди-Вайнберга при использовании оригинальных и альтернативных праймеров в выборках с островов Итуруп и Кунашир.

| | Места взятия проб | N | исследуемых гомозигот | обнаруженных нуль-аллелей | P1 | P2 |
|----------------|-------------------|----|-----------------------|---------------------------|--------|--------|
| Итуруп 2004 | оз.Сопочное | 50 | 9 | 3 | 0,2209 | 0,1843 |
| | р.Рыбацкая | 50 | 22 | 14 | 0,0001 | 0,0528 |
| | Рейдово | 50 | 14 | 11 | 0,4359 | 0,8328 |
| | Кетовый | 50 | 22 | 6 | 0,0001 | 0,0928 |
| | оз.Куйбышевское | 50 | 13 | 2 | 0,2391 | 0,2871 |
| Итуруп 2005 | Оз.Сопочное (ус.) | 50 | 18 | 9 | 0,0106 | 0,2056 |
| | руч.Порожистый | 50 | 17 | 8 | 0,3253 | 0,9043 |
| | оз.Сопочное | 50 | 22 | 5 | 0,0343 | 0,4784 |
| | Рейдово 1 | 50 | 19 | 5 | 0,0553 | 0,0759 |
| | Рейдово 2 | 50 | 6 | 1 | 0,1059 | 0,4047 |
| | Рейдово 3 | 50 | 17 | 9 | 0,0346 | 0,6356 |
| | Кетовый 1 | 50 | 15 | 7 | 0,1437 | 0,7203 |
| | Кетовый 2 | 50 | 16 | 7 | 0,0012 | 0,0091 |
| | Кетовый 3 | 50 | 14 | 5 | 0,0553 | 0,2051 |
| | р.Рыбацкая | 50 | 19 | 8 | 0,0012 | 0,1965 |
| оз.Благодатное | 50 | 16 | 7 | 0,0851 | 0,9409 | |
| Кунашир 2005 | р.Серноводка | 50 | 20 | 12 | 0,0015 | 0,4447 |
| | р.Ильюшенка | 50 | 25 | 13 | 0,0001 | 0,3987 |
| Итуруп 2006 | р.Порожистый | 50 | 23 | 9 | 0,0003 | 0,0337 |
| | оз.Куйбышевское | 50 | 23 | 6 | 0,0021 | 0,0406 |
| | оз.Благодатное | 50 | 18 | 9 | 0,0001 | |
| Итуруп 2007 | оз.Сопочное(пр.) | 50 | 29 | 8 | 0,0086 | 0,1797 |
| | оз.Сопочное | 50 | 16 | 5 | 0,1918 | 0,0887 |
| | оз.Лебединое | 50 | 12 | 6 | 0,1597 | 0,2831 |
| | оз.Куйбышевское | 50 | 8 | 4 | 0,4187 | 0,7151 |

Таблица 6.3. Результаты теста на равновесие Харди-Вайнберга при использовании оригинальных и альтернативных праймеров в выборках с Приморского Края, Магаданской области, Аляски.

| | Места взятия проб | N | исследуемых гомозигот | обнаруженных нуль-аллелей | P1 | P2 |
|---------------------|--------------------|----|-----------------------|---------------------------|--------|--------|
| Приморский Край | р. Нарва 2007 | 51 | 13 | 2 | 0,4019 | 0,5213 |
| | р. Нарва 1995 | 51 | 11 | 2 | 0,2886 | 0,4263 |
| | р. Нарва 2006 | 42 | 9 | 2 | 0,7081 | 0,7501 |
| | р. Нарва 2005 | 20 | 8 | 5 | 0,0151 | 0,9969 |
| | р. Киевка 2002 | 12 | 6 | 4 | 0,0044 | 0,7625 |
| | р. Киевка 2003 | 11 | 4 | 3 | 0,0256 | 0,7294 |
| | р. Авакумовка 1994 | 26 | 7 | 2 | 0,1343 | 0,4213 |
| Аляска | Teslin (48) | 48 | 16 | 0 | 0,4375 | 0,4813 |
| | Snake (48) | 48 | 11 | 0 | 0,5544 | 0,4875 |
| Магаданская область | р. Яна2+3 | 49 | 9 | 2 | 0,5012 | 0,5743 |
| | р. Яма | 50 | 24 | 12 | 0,4672 | 0,9662 |
| | р. Кулькиты М | 50 | 19 | 9 | 0,0428 | 0,4318 |
| | р. Кулькиты | 50 | 13 | 7 | 0,0472 | 0,3137 |

P1 – тест на отклонение от равновесия Х.-В. при использовании оригинальных праймеров *Oke3*; P2 – отклонение от равновесия Х.-В. при использовании альтернативных праймеров *Oke3*; порог достоверности – $P < 0,05$.

Таблица 6.4. Результаты теста на равновесие Харди-Вайнберга при использовании оригинальных и альтернативных праймеров в выборках с п-ва Камчатка и Чукотского Автономного Округа.

| | | | | | | |
|---------------------------------|--------------|----|----|---|--------|--------|
| Чукотский Автономный Округ 2007 | р.Анадырь 1 | 50 | 14 | 4 | 0,3431 | 0,4512 |
| | р.Анадырь 2 | 50 | 17 | 6 | 0,0031 | 0,0369 |
| | р.Анадырь 3 | 50 | 19 | 7 | 0,0093 | 0,0931 |
| Камчатка 2007 | р. Камчатка | 50 | 12 | 5 | 0,5251 | 0,4675 |
| | р. Паратунка | 52 | 16 | 6 | 0,2275 | 0,7731 |
| | р. Большая | 50 | 13 | 1 | 0,0341 | 0,1839 |
| | р. Быстрая | 14 | 4 | 2 | 0,2344 | 0,7251 |
| | р. Налычева | 16 | 5 | 2 | 0,0566 | 0,4819 |
| | р. Авача | 50 | 13 | 2 | 0,4341 | 0,5894 |

P1 – тест на отклонение от равновесия Х.-В. при использовании оригинальных праймеров *Oke3*; P2 – отклонение от равновесия Х.-В. при использовании альтернативных праймеров *Oke3*; порог достоверности – $P < 0,05$.

Выявленные в ходе работы нуль-аллели, существенно повлияли на интерпретацию популяционных данных. Ранее в 25 из 66 выборок кеты с Дальнего Востока выявлялось отклонение от равновесия Харди-Вайнберга. После использования альтернативных праймеров для проведения ПЦР локуса *Oke3*, в 20 выборках кеты с различных регионов отклонение от равновесия Харди-Вайнберга не наблюдалось. Но, в 5 выборках кеты при использовании альтернативных праймеров, по прежнему наблюдалось отклонение от равновесия Х.-В. В данном случае это явление может быть объяснено тем, что исследуемые выборки представляют собой смесь различных популяций (Адо-Тымовский ЛРЗ (2004), Курильский ЛРЗ-2 (2005г.), руч. Порожистый, оз. Куйбышевское и р. Анадырь-2). Особенно

это касается выборок из ручья Порожистый с озер Сопочное (о.Итуруп) и Куйбышевское (о.Итуруп), так как предполагается, что в данных выборках могли присутствовать особи как, речной так, и озерной формы кеты. Имея различные частоты аллелей в популяциях, их смешивание могло привести к возникновению эффекта Валунда. Выборка №2 с Курильского ЛРЗ за 2005 год, была собрана из ставников, находящихся в прибрежной зоне в заливе, а не в реке на нерестилище, что дает возможность предположить, что в данной выборке, также может иметь место смесь рыб из различных нерестовых субпопуляций, этим объясняется обнаруженное отклонение от равновесия Харди-Вайнберга. Не исключается, возможность наличия не определенной нами мутации в зоне отжига альтернативных праймеров, что может приводить к возникновению нового нуля-аллеля.

При обработке результатов были рассчитаны и сопоставлены значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности при использовании оригинальных и альтернативных пар праймеров при постановки ПЦР в исследуемых выборках кеты (Рис. 2.1; 2.2).

Рис.2.1. Показатели ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности в выборках кеты по локусу *Oke3* без учета нуля-аллелей.

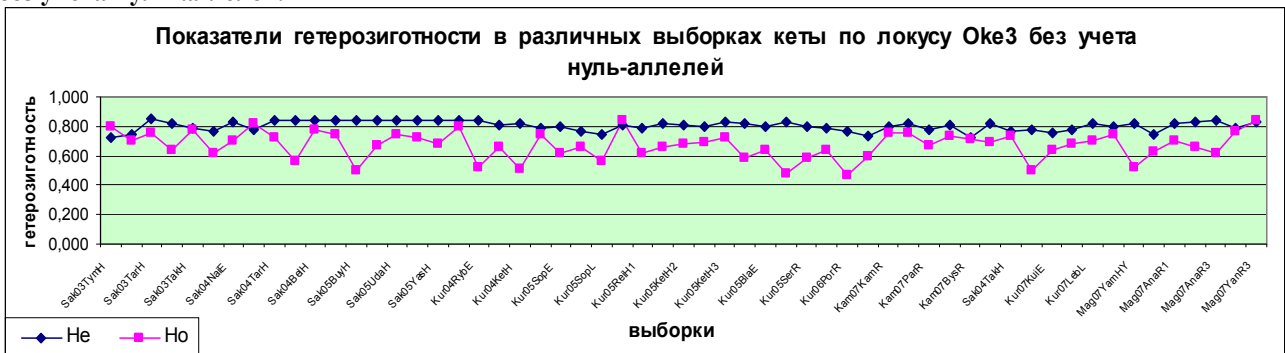
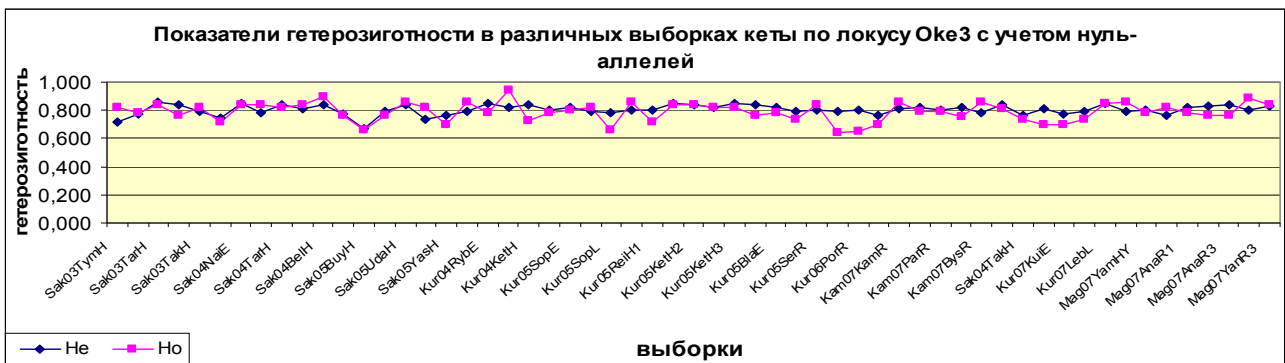


Рис. 2.2. Показатели ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности в выборках кеты по локусу *Oke3* с учетом нуля-аллелей.



Как видно на рисунках 2.1., 2.2., при использовании оригинальных праймеров к локусу *Oke3* в исследуемых выборках кеты кривая ожидаемой гетерозиготности (H_o) значительно отклоняется от кривой наблюдаемой гетерозиготности (H_e), в сторону недостатка гетерозигот. После применения альтернативных праймеров № 8 и № 20 кривая характеризующая ожидаемую гетерозиготность, практически совпадает с кривой наблюдаемой гетерозиготности, за исключением нескольких случаев, описанных выше. В результате использования альтернативных праймеров при проведении ПЦР по локусу *Oke3* выявлено, что данный метод исследования нуль-аллелей позволяет существенно уточнить и исправить полученные ранее результаты, что не может не сказаться на более точной интерпретации популяционных данных.

Географическое распределение выявленных нуль-аллелей по локусу *Oke3*.

Выявление редкого аллеля №11.

Следующим этапом работы было изучение географического распространения обнаруженных нуль-аллелей во всех исследуемых нами выборках кеты. В ходе работы был выявлен очень редкий аллель №11. Данный аллель при использовании оригинальных праймеров встречался ранее только у шести из исследуемых 4000 образцов кеты. При использовании модифицированных праймеров частота этого аллеля для некоторых выборок с острова Итуруп, возросла с 0 до 12%. Наибольшая частота этого аллеля при использовании альтернативных праймеров наблюдалась на островах Итуруп и Сахалин.

Самые высокие частоты аллеля №11 наблюдались на острове Итуруп. По-видимому, мутация находящаяся в зоне отжига оригинального праймера сцеплена с определенным количеством повторов в микросателлитном локусе, формируя так называемый «снипстер» (SNPSTR). В дальнейшем возможно использование таких мутаций в качестве дополнительных маркеров для дифференциации различных популяций кеты.

Распределение выявленных нуль-аллелей локуса *Oke3* по всему исследуемому ареалу кеты.

Нам было интересно узнать, как распределяются новообнаруженные нуль-аллели по регионам Дальнего Востока, то есть определить частоты обнаруженных аллелей в различных выборках. Было выдвинуто предположение, что для крупных регионов, таких как Камчатка, Курильские острова или Сахалин, характерны определенные нуль-аллели, которые могут влиять на дифференцирующую способность локуса *Oke3*. Ранее, было выявлено, что аллель №4, обнаруженный как нуль-аллель особенно распространен на о. Кунашир и в Магаданской области, а аллель №11 чаще встречается на островах Итуруп и о. Сахалин. В Чукотском Автономном Округе чаще выявлялись аллели №6 и №8. Интересно, что хотя на о. Сахалин чаще распространен аллель №11, на нем встречаются все обнаруженные типы нуль-аллелей, характерные для других регионов. По данным американских исследователей (Beacham T. D. 2009), в локусе *Oke3* в различных выборках американской кеты, не было обнаружено отклонения от равновесия Харди-Вайнберга и не были выявлены нуль-аллели. Это было подтверждено и нами, при исследовании двух выборок из Аляски.

Данные по географическому распределению обнаруженных нуль-аллелей, при использовании для проведения ПЦР альтернативных праймеров, представлены в таблице №8. Интересным фактом является, что на о. Кунашир наиболее распространенным является аллель №4, а на о. Итуруп – аллель №11, но эти два острова Курильской гряды расположены в непосредственной близости друг от друга. Таким образом, полученные результаты позволяют увеличить дифференцирующую способность локуса *Oke3* не только для крупных регионов, но и для субпопуляций в пределах небольшого географического региона.

Дифференциация популяций кеты различных регионов по локусу *Oke3* при использовании альтернативных праймеров.

Следующим этапом нашей работы было определение дифференцирующей способности локуса *Oke3* с использованием альтернативных праймеров №8 и №20 при постановке ПЦР. При сравнении полученных данных по крупным регионам, таким, как северная часть ареала кеты (выборки с Чукотского Автономного Округа, Магадана и Камчатки) с южной частью (выборки с о.Сахалин, южных островов Курильской гряды Кунашир и Итуруп и Приморского края) не выявило различий в показателях дифференциации (Таблица 7).

Сравнивая значение дифференциации между выборками о. Сахалина и Курильских островов наблюдалось даже небольшое снижение этого показателя за счет того, что в этих регионах с высокой частотой встречаются одинаковые аллели №11 и №4. Такой же эффект и по тем же причинам, наблюдается при сравнении между собой популяций Сахалина и Камчатки, Южного и Северного Сахалина. Но на островах Итуруп и Кунашир, распространение различных нуль-аллелей приводит к небольшому увеличению показателя дифференциации между этими выборками.

В итоге при сравнении популяций кеты крупных регионов в большинстве случаев дифференциация не меняется, в некоторых случаях незначительно снижается. Причиной этого является наличие сходных типов выявленных нуль-аллелей, либо их незначительное количество в исследуемых популяциях.

Таблица 7. Дифференциация между различными популяциями кеты по локусу *Oke3*.

| Выборки | Показатели дифференциации Theta-P (GDA) | |
|-----------------------------|---|-----------------|
| | без нуль-аллелей | с нуль-аллелями |
| Крупные регионы: | | |
| Север*; Юг** | 0,0332 | 0,0368 |
| Сахалин; Курилы | 0,0921 | 0,0858 |
| о.Итуруп; о.Кунашир | 0,0278 | 0,0307 |
| Зап. Сах; Вост. Сах. | 0,0511 | 0,0478 |
| Сахалин; Камчатка | 0,0456 | 0,0395 |
| Камчатка; Магадан | 0,0048 | 0,0075 |
| Камчатка; Анадырь | 0,0225 | 0,0233 |
| Анадырь; Магадан | 0,0197 | 0,0321 |
| Отдельные популяции: | | |
| Серноводка; Ильюшенка | 0,0124 | 0,0085 |
| Ильюшенка; Сопочное Е | 0,0358 | 0,0441 |
| Сопочное (устье); Анадырь 3 | 0,0616 | 0,0739 |
| Яма (Магадан); Ильюшенка | 0,0447 | 0,0643 |
| Яма (Магадан); Сопочное Е | 0,0428 | 0,0843 |

*- все исследуемые выборки Чукотского Автономного Округа, п-ва Камчатки, Магаданской области

** - все исследуемые выборки островов Сахалин, Кунашир, Итуруп и выборки Приморского Края.

При сравнении отдельно взятых выборок принадлежащих разным регионам, было выявлено увеличение показателей дифференциации. Например, при сравнении выборки с озера Сопочное 2005 (о.Итуруп) и выборки - Яма(Магадан), было выявлено увеличение дифференциации с 4,3% до 8,4% по локусу *Oke3*. Такой эффект появляется за счет того, что нуль-аллелем в выборке с озера Сопочное (о.Итуруп) выявляется только аллель №11, а в выборке с Магадана аллель №4 (Таблица 8).

Таблица 8. Дифференциация между выборками Сопочное 05(Итуруп) и Яма (Магадан).

| Oke3 | Показатели дифференциации (Theta-P) | |
|--------|-------------------------------------|----------------|
| | без нуль-аллеля | с нуль-аллелем |
| аллели | | |
| все | 0,0428 | 0,0843 |
| 12 | *** | 0,0204 |
| 11 | *** | 0,0816 |
| 9 | *** | *** |
| 10 | 0,0136 | 0,0102 |
| 2 | *** | *** |
| 1 | 0,1641 | 0,2037 |
| 7 | 0,0078 | 0,0069 |
| 8 | 0,0341 | 0,0271 |
| 5 | 0,0085 | 0,0058 |
| 3 | 0,0097 | 0,0109 |
| 6 | 0,0131 | 0,0084 |
| | 0,1219 | 0,2467 |

*** - отсутствие данного аллеля в исследуемых выборках

Приведенные выше примеры свидетельствуют, что выявление нуль-аллелей приводит к значительным уточнениям статистических данных при изучении популяционной структуры кеты по микросателлитным локусам. Поскольку изучаемый объект представляет собой ценный промысловый вид лососевых рыб, воспроизводство которого, в последнее время только увеличивается, то данный метод позволяет более точно интерпретировать полученные популяционные данные. Такие исследования необходимы для дальнейшей сертификации и идентификации отдельных популяций и стад кеты.

Выявление локализации мутаций, вызывающих появление нуль-аллелей.

Следующим этапом нашей работы для более детального анализа было выявление локализации мутации. Для всех образцов, в которых были обнаружены нуль-аллели по локусу *Oke3* требовалось определить с какой 5' или 3' зоны относительно тела микросателлита произошла мутация. Для решения поставленной задачи проводились ПЦР с различными комбинациями оригинальных и альтернативных праймеров. Пример определения локализации мутации показан на рисунке 4.

Для этого был взят образец, в котором при помощи альтернативных праймеров ранее был выявлен нуль-аллель и поставлены следующие ПЦР.

Дорожки №1, 2, 3: продукт амплификации образца №1 с использованием прямого альтернативного праймера №8 (Таблица №2) и оригинального обратного праймера №21. В результате, на фореграмме мы можем наблюдать гомозиготу, что говорит о том, что мутация находится в зоне обратного оригинального праймера, взятого из статьи.

Для получения ПЦР продуктов видимых на дорожке № 2а были использованы прямой оригинальный праймер №9 и обратный альтернативный праймер № 20. На фореграмме видна четкая гетерозигота, позволяющая сказать, что данные праймеры отжигаются вне зоны искомой нами мутации. То же, можно сказать и про дорожку № 3а, где визуализируется гетерозигота, полученная при использовании прямого и обратного альтернативных праймеров (№ 8, № 20).

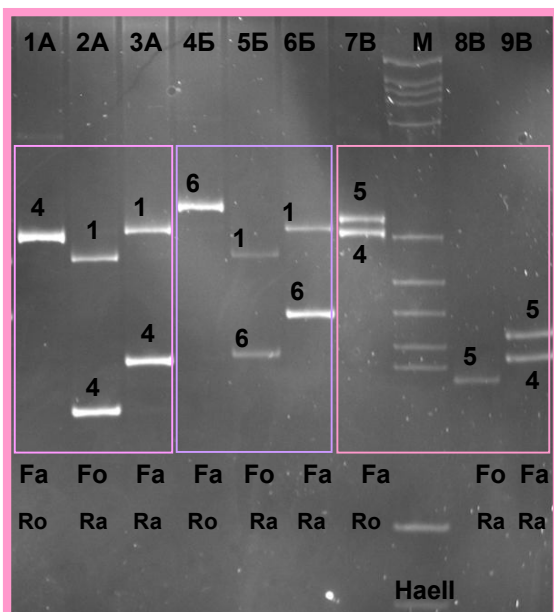


Рис. 4. Поиск мутаций в области отжига прямого и обратного альтернативных праймеров. 1А, 2А, 3А-образец №1; 4Б, 5Б, 6Б – образец №2; 7В, 8В, 9В – образец №3; Маркировка праймеров: Fa – прямой альтернативный, Fo – прямой оригинальный, Ra – обратный альтернативный, Ro – обратный оригинальный. Внутри рамок указаны цифрами - 4, 5, 6, 11 типы аллелей, выявленные при использовании праймеров указанных под дорожкой.

Способом, описанным выше, были изучены все 332 образца, в которых были обнаружены нуль-аллели.

В результате исследований выявлено, что для большинства образцов несущих в себе нуль-аллель мутация произошла в зоне обратного оригинального праймера. Интересно что, для аллеля №4 мутация произошла как в зоне прямого, так и в зоне обратного праймера. Обнаружено, что мутация, локализованная в зоне прямого праймера, чаще встречается на о. Сахалин и о. Итуруп, а мутация в зоне отжига обратного оригинального праймера чаще выявляется, в основном, в Магаданской области, и в единичных случаях в других регионах Дальнего Востока. Это увеличивает дифференцирующую способность локуса *Oke3*.

ГЛАВА 5. Секвенирование и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей разных видов рыб рода *Oncorhynchus* по локусу *Oke3*.

Подбор праймеров для секвенирования локуса *Oke3* для всех видов рыб рода *Oncorhynchus*.

Используя известные данные о первичной нуклеотидной последовательности ДНК микросателлитного локуса *Oke3*, имеющиеся в открытой международной базе NCBI, нами были сконструированы праймеры для проведения секвенирования исследуемого локуса, представленные в таблице 9. С помощью сконструированных праймеров были секвенированы образцы всех видов рыб рода *Oncorhynchus* по локусу *Oke3*: кета, нерка, горбуша, сима, кижуч, чавыча. Для подробного изучения нуклеотидной последовательности этого локуса праймеры подбирались так, чтобы охватить весь известный участок. Данные, полученные в результате секвенирования исследуемых образцов, обрабатывались при помощи пакета программ «Lasergene» и «SeqManNgen».

Таблица №9. Праймеры для секвенирования, подобранные к локусу *Oke3*

| виды | праймеры для секвенирования | t отжига °C |
|---------|--|-------------|
| Кета | (F): 5'-GGATCTGGGCATGTTATCAC-3' | 58 |
| | (R): 5'-GAGATAAGAGAGAAAAACAAGGATCA-3' | |
| | (F): 5'-GGATCTGGGCATGTTATCAC | 60 |
| | (R): 5'-ATCAGGGTATGGATATGCAG | |
| Горбуша | (F): 5'-GGATCTGGGCATGTTATCAC-3' | 58 |
| | (R): 5'-GAGATAAGAGAGAAAAACAAGGATCA-3' | |
| Нерка | (F): 5'-GGATCTGGGCATGTTATCAC-3' | 56 |
| | (R): 5'-GAGATAAGAGAGAAAAACAAGGATCA-3' | |
| Сима | (F): 5'-GGATCTGGGCATGTTATCAC-3' | 58 |
| | (R): 5'-GAGATAAGAGAGAAAAACAAGGATCA-3' | |
| Кижуч | (F): 5'-GGATCTGGGCATGTTATCAC-3' | 58 |
| | (R): 5'-CAGGGATATGCAGTAAATAGT-3' | |
| Чавыча | (F): 5'-GGATCTGGGCATGTTATCAC-3' | 58 |
| | (R): 5'-GGATCAGGGATATGCAGTAAATAGTA -3' | |

F-прямой праймер; R-обратный праймер.

Результаты секвенирования 5' фланкирующей зоны микросателлитного локуса кеты - *Oke3*.

Для подробного изучения нуклеотидной последовательности локуса *Oke3* у кеты были исследованы 6 образцов, в которых ранее были обнаружены нуль-аллели. При изучении 5' фланкирующей зоны микросателлитного локуса *Oke3* у кеты, мы обнаружили единичную замену (SNP) цитозина на тимин, в позиции 126 по отношению к секвенированной последовательности AF330220, зарегистрированной в открытой международной базе NCBI. Данный SNP приводит к тому, что оригинальный праймер не отжигается на ДНК образца. Это приводит к ложной гомозиготности, или полному отсутствию ПЦР продукта и соответственно - появлению эффекта нуль-аллеля. Использование альтернативного праймера, последовательность которого лежит вне зоны этой мутации, позволяет выявить аллель №4. Также в 5' фланкирующей зоне был обнаружена ещё одна единичная замена цитозина на тимин, лежащая вне зоны отжига оригинального праймера, в позиции 84 по отношению к секвенированной последовательности AF330220. В итоге все выявленные снипы в дальнейшем можно учитывать не только для подбора праймеров, но и как дополнительные маркеры при популяционных исследованиях кеты.

Результаты секвенирования 3' фланкирующей зоны микросателлитного локуса кеты - *Oke3*.

Для выявления причин возникновения нуль-аллелей в 3' фланкирующей зоне микросателлитного локуса *Oke3* мы проводили ПЦР, комбинируя различные праймеры, но в большинстве случаев амплификация нуль-аллеля не происходила. Изначально, нуль-аллели были обнаружены при помощи альтернативного обратного праймера №20, который расположен наиболее близко к телу микросателлита, а дальнейший сдвиг альтернативных праймеров в сторону 3' конца от тела микросателлита, не приводило к положительным результатам в выявлении ранее обнаруженных нуль-аллелей. Поэтому на данном этапе работы нам не удалось определить мутации, приводящие к появлению нуль-аллелей со стороны 3' фланкирующей зоны от тела микросателлита.

Для решения поставленной проблемы было решено укоротить один из обратных праймеров (№4 в таблице 10). И в результате амплификации с обратным праймером №4 была получена гетерозигота, у которой в дальнейшем и была исследована нуклеотидная последовательность. Было выявлено большое количество SNP во 3' фланкирующей тело

микросателлита зоне. Выяснилось, что эффект нуль-аллеля вызывала мутация, находящаяся в позиции 356 по отношению к известной секвенированной последовательности AF330220 (NCBI) и представляющая собой транзицию тимина на цитозин.

Все выявленные однонуклеотидные замены описаны в таблице 10.

Таблица 10. Мутации, выявленные во фланкирующих микросателлит зонах локуса *Oke3*.

| Позиция к AF330220 | выявленные SNP |
|------------------------|----------------|
| В 5' фланкирующей зоне | |
| 84 | c/t |
| 127 | c/t |
| В 3' фланкирующей зоне | |
| 327 | t/a |
| 342 | g/a |
| 350 | a/c |
| 357 | t/g |
| 368 | c/g |
| 370 | a/t |
| 381 | t/c |

В результате можно сказать, что мы обнаружили мутации, приводящие к возникновению нуль-аллелей. Благодаря полученным данным, при дальнейшей работе с этим локусом можно подбирать праймеры, избегая тех мест, где обнаружены SNP.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей тела микросателлитного локуса *Oke3* у разных видов рыб рода *Oncorhynchus*.

В результате секвенирования микросателлитного локуса *Oke3* у разных видов рыб рода *Oncorhynchus*, были обнаружены некоторые закономерности.

У микросателлитного локуса *Oke3* тело самого микросателлита, которое состоит из 13 нуклеотидных пар и повторяется несколько раз, обнаружено только у кеты, горбуши и нерки, то есть у группы видов эволюционно близких друг к другу. Похожие мотивы встречается у симы, микижи, кижуча и чавычи, но они не идентичны по нуклеотидному составу, так как имеются единичные нуклеотидные замены, делеции и вставки нуклеотидных оснований.

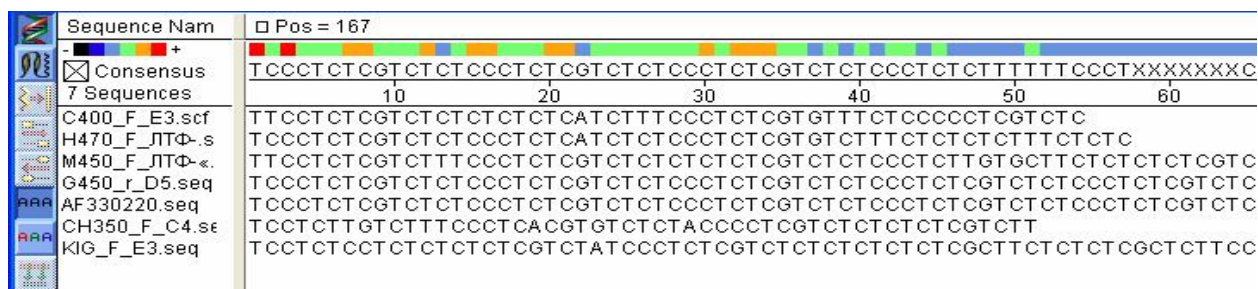


Рис. 6. Результаты секвенирования микросателлитного тела локуса *Oke3* у 7 видов рыб рода *Oncorhynchus*. C400 – сима; H470 – нерка; M450 – микижа; G450 – горбуша; AF330220 – кета; CH350 – чавыча; KIG – кижуч.

Главное, что все представленные мотивы у выше перечисленных видов не имеют повторений, то есть встречаются только 1 раз в цепочке ДНК, не представляя собой тандемные повторы. В результате, представленный локус *Oke3*, как микросателлитный, можно считать только у кеты, горбуши и нерки. По-видимому, данный микросателлитный локус *Oke3*, является эволюционно новым образованием, сформировавшимся вместе с группой тихоокеанских лососей, в которую входят кета, горбуша и нерка.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фланкирующих зон микросателлитного локуса *Oke3* у разных видов рыб рода *Oncorhynchus*.

В результате изучения нуклеотидной последовательности 5' фланкирующей зоны от тела микросателлитного локуса *Oke3* у всех видов рыб рода *Oncorhynchus* были обнаружены консервативный участок. На этом участке, расположенном в позиции от 104 до 140 по отношению к известной секвенированной последовательности AF330220 (NCBI) не было обнаружено нуклеотидных замен, делеций или инсерций. Можно предположить, что данный участок у описанных видов играет какую-либо функцию в структурной организации ДНК. Обнаружены некоторые единичные замены, локализованные у разных видов в различных позициях по отношению к известной секвенированной последовательности AF330220 (NCBI).

У кеты в позиции 156 обнаружена делеция, протяженностью в 18 нуклеотидов (acggtcacttcacctct), по отношению ко всем остальным видам рыб рода *Oncorhynchus*. Причем данного участка ДНК не было у всех 12 исследованных при помощи секвенирования аллелей микросателлитного локуса *Oke3*. Возможно, в дальнейшем, выявленную делецию можно использовать в качестве маркера для идентификации кеты, особенно при отборе мальков на исследование.

При исследовании нуклеотидной последовательности 3' фланкирующей зоны от тела микросателлитного локуса *Oke3* также было обнаружено большое количество единичных замен. Обнаружен еще один консервативный участок ДНК у всех исследуемых образцов рыб рода *Oncorhynchus*, находящийся в положении 295-324 по отношению к известной секвенированной последовательности AF330220 (NCBI). При исследовании двух аллелей чавычи был выявлен сателлитный повтор протяженностью в 119 нуклеотидных пар. В дальнейшем эту последовательность также можно использовать в качестве дополнительного маркера у этого вида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате нашей работы было показано влияние нуль-аллелей на интерпретацию популяционных данных на примере различных стад кеты Дальнего Востока.

При исследовании 66 выборок кеты из различных регионов по локусу *Oke3*, в 25 выборках было выявлено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга. Причиной данного явления оказалось наличие нуль-аллелей в данном локусе. Для выявления нуль-аллелей было подобрано большое количество альтернативных праймеров и обнаружены те, которые выявляют нуль-аллель. Причем было показано, что для некоторых крупных регионов (о. Сахалин, Курильские острова, п-ов Камчатка) характерны свои, определенные нуль-аллели. При сопоставлении полученной информации с существующей базой данных обнаружено, что в 20 выборках из 25, в которых ранее было выявлено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, оно не наблюдается, т. е. предложенный метод позволяет выявить весь спектр аллельного разнообразия, ранее «скрытого» за нуль-аллелями.

В результате использования альтернативных праймеров при проведении ПЦР по локусу *Oke3* выявлено, что данный метод исследования нуль-аллелей позволяет существенно уточнить и исправить полученные ранее результаты, что обеспечивает более точную интерпретацию популяционных данных. На основании результатов этой работы можно сделать общее заключение, что в случае обнаружения ДНК-маркера, в котором есть подозрения на наличие в нем нуль-аллелей, необходимо проводить аналогичную работу.

Нами изучено географическое распределение различных нуль-аллелей, выявленных в локусе *Oke3* в выборках кеты с разных регионов Дальнего Востока. Обнаружено, что выявление нуль-аллелей приводит к значительным уточнениям популяционной структуры кеты по микросателлитным локусам. Если не выявлять нуль-аллели, то наблюдаемые различия между стадами (популяциями) могут быть, как завышены, так и занижены в зависимости от спектра скрытых аллелей: скрытые аллели снижают истинную дифференциацию между популяциями в случаях, когда в разных регионах встречаются разные нуль-аллели, и увеличивают, когда они одинаковы. Поскольку изучаемый объект

представляет собой ценный промысловый вид лососевых рыб, воспроизводство которого в последнее время значительно увеличивается, а данный прием позволяет более точно интерпретировать полученные популяционные данные, то такие исследования необходимы для прикладных вопросов сертификации промысла и идентификации популяций кеты.

При помощи секвенирования нуклеотидной последовательности локуса *Oke3* кеты были выявлены мутации, приводящие к появлению нуль-аллелей. Эти мутации в дальнейшем можно учитывать не только для подбора праймеров к данному локусу, но и в качестве дополнительных маркеров при популяционных исследованиях кеты.

Проведено секвенирование и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей разных видов рыб рода *Oncorhynchus* по локусу *Oke3*. Выявлено, что представленный локус *Oke3*, как микросателлитный, можно считать только у трех видов рода - кеты, горбуши и нерки, так как tandemные повторы встречаются только у этих видов. По-видимому, данный микросателлитный локус *Oke3*, является эволюционно новым образованием, сформировавшимся вместе с этой группой видов рода *Oncorhynchus*. У микижи, симы, кижуча и чавычи как такового tandemного повтора нет. У чавычи был выявлен сателлитный повтор протяженностью в 119 нуклеотидных пар. В результате при популяционных исследованиях различных видов по одним и тем же микросателлитным локусам, необходимо предварительно изучить их нуклеотидную последовательность для уточнения статуса данного локуса.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны альтернативные праймеры к микросателлитному локусу *Oke3* кеты, которые позволили выявить нуль-аллели и устранить вызванную ими ложную гомозиготность. Выявлено, что причиной появления нуль-аллелей в некоторых случаях являются мононуклеотидные замены (SNP) в праймерной зоне.

2. Изучено географическое распределение обнаруженных нуль-аллелей в популяциях кеты и показано, что в каждом регионе чаще распространен свой определенный нуль-аллель. В большинстве выборок, в которых до использования альтернативных праймеров выявлялось отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, с их применением оно исчезло вместе с ложными гомозиготами. А в пяти выборках, в которых осталось отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, его причиной предполагается смесь различных популяций.

3. Выявлено влияние нуль-аллелей на дифференцирующую способность локуса: они смещают оценку степени дифференциацию как в большую, так и в меньшую сторону. Показано, что при сравнении выборок кеты из регионов с высокой частотой различающихся нуль-аллелей локуса *Oke3* степень дифференциации занижается из-за их присутствия и поэтому может значительно возрасти при использовании альтернативных праймеров. Напротив, степень дифференциации может быть завышена, если в различных популяциях встречаются одинаковые нуль-аллели; использование альтернативных праймеров позволяет оценить фактическую степень дифференциации.

4. Анализ нуклеотидной последовательности локуса *Oke3* показал существенные различия первичной структуры ДНК для всех видов рыб рода *Oncorhynchus*. Сам микросателлит обнаружен только у кеты, горбуши и частично у нерки, а у всех остальных видов он как таковой не выявлен. Поскольку указанная триада видов является самой молодой среди тихоокеанских лососей, то это говорит о том, что данный микросателлит в эволюционном плане является новым образованием, сформировавшимся у этой группы.

5. Обнаружены консервативные участки ДНК в 5' и 3' фланкирующих зонах локуса *Oke3* для всех видов тихоокеанских лососей (в позиции 104-140 и 295-324 по отношению к известной секвенированной последовательности AF330220), возможно играющие важную роль в структурной организации ДНК.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

Статья в реферируемом журнале:

1. С. Ю. Кордичева, Г. А. Рубцова, М. В. Шитова, Г. О. Шайхаев, К. И. Афанасьев, Л. А. Животовский. ВЫЯВЛЕНИЕ НУЛЬ-АЛЛЕЛЕЙ В МИКРОСАТЕЛЛИТНОМ ЛОКУСЕ КЕТЫ (*Oncorhynchus keta* Walbaum). *ГЕНЕТИКА*, 2010, том 46, № 8, с. 1143–1147

Тезисы:

1. С.Ю. Кордичева, Г.А.Рубцова, М.В.Шитова, Г.О.Шайхаев, К.И.Афанасьев, Л.А.Животовский Географическое распределение нуль-аллелей в популяциях кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum)// Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб. Тезисы докладов Международной конференции. – СПб.: Нестор-История, 2010, с.89-91. (20-22 апреля 2010 г)

2. Кордичева С.Ю., Рубцова Г.А., Шитова М.В., Шайхаев Г.О., Афанасьев К.И., Животовский Л.А. Влияние нуль-аллелей на интерпретацию популяционных данных (на примере кеты *Oncorhynchus keta* Walbaum)// Проблемы экологии: чтения памяти проф. М.М. Кожова: тез. док. междунар. науч. конф. и междунар. шк. для мол. ученых (Иркутск, 20-25 сентября 2010 г.) – Иркутск: Изд-во, Иркут. гос. ун-та, 2010, с.202

3. Кордичева С.Ю., Рубцова Г.А., Шитова М.В., Афанасьев К.И., Животовский Л.А. Интерпретация популяционных данных при выявлении нуль-аллелей на примере кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum)// Геномика и биология клетки: тез. док. IV междунар. шк. мол. уч. по молек. генетике (Звенигород, 29 ноября – 3 декабря 2010), с. 120-121