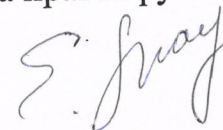


На правах рукописи



Шайхаев Евгений Гаджирамазанович

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ
ИЗМЕНЧИВОСТИ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2013г.

Работа выполнена в лаборатории генетических проблем идентификации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Животовский Лев Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Сулимова Галина Ефимовна

Заведующий лабораторией
сравнительной генетики животных
Института общей генетики имени Н.И.
Вавилова РАН

доктор биологических наук

Холодова Марина Владимировна

Руководитель кабинета методов
молекулярной диагностики Института
проблем экологии и эволюции имени
А.Н. Северцева РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток.

Защита состоится « 7 » ноября 2013 г. в 15:00 час. на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: Москва, 119991, ГСП-1, ул. Губкина, д 3. Тел.: 499 135-62-13, 499 135-14-31. aspirantura@vigg.ru. Факс: 499 132-89-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан «23» апреля 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Синельщикова Татьяна Аркадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Лососевые рыбы являются ценнейшим водным биоресурсом российского Дальнего Востока. Их природные популяции широко распространены в бассейне Тихого океана и имеют разные по протяженности нерестовые ареалы на азиатском и северо-американском континентах.

Последние два десятилетия наиболее популярными маркерами для популяционно-генетических исследований лососевых рыб являются микросателлиты – последовательности, состоящие из большого количества коротких повторов и отличающиеся высоким уровнем аллельного полиморфизма (Goldstein and Schlötterer 1999; Животовский, 2006; Bhargava, Fuentes, 2009).

Микросателлиты могут амплифицироваться не только у тех видов, у которых они были идентифицированы, но и у других филогенетически близких видов (Ellegren, 2004). Важно подчеркнуть возможность амплификации у разных видов с использованием одной и той же пары праймеров – т.н. перекрестная амплификация (трансферабельность). Хотя возможность перекрестной амплификации снижается с увеличением эволюционной дистанции между видами, тем не менее, при ее успешности можно получить универсальные праймеры сразу для нескольких видов. Такие универсальные праймеры могут быть полезными для решения некоторых прикладных задач.

Микросателлиты, вне зависимости от вида, могут сохранять свои свойства высоко-полиморфных генетических маркеров. В связи с этим, универсальные праймеры позволяют расширить уже известный набор локусов, избавив исследователя от сложных и продолжительных по времени работ по обнаружению и разработке новых локусов для популяционно-генетических исследований и индивидуальной идентификации. В свою очередь, полиморфизм одних и тех же локусов в зависимости от вида может отличаться – вплоть до того, что локус, проявляющий высокий уровень полиморфизма у одного вида, может быть мономорфным у другого, даже филогенетически близкого вида (Morin et al., 1998; Ellegren et al., 1995). Обнаруженные между видами различия в полиморфизме, а также интервалах размеров аллелей, могут использоваться для целей внутривидовой идентификации и выявления межвидовых гибридов (Routtu et al., 2003; Vanhaecke et al., 2012).

В связи с тем, что промысел и воспроизводство ценных видов лососевых рыб постоянно увеличивается, разработки генетических маркеров для их идентификации на видовом и внутривидовом уровнях становятся особенно актуальными.

Микросателлитная изменчивость на межвидовом уровне характеризуется не только различиями в количестве повторов, но также и изменениями структуры повторов и фланкирующих регионов. Лососевые рыбы представляют большой

интерес для филогенетических исследований. Несмотря на большое количество данных, полученных с помощью анализа различных признаков, как морфологических так и молекулярных, некоторые вопросы, касающиеся филогении лососевых рыб, остаются до конца не выясненными (Crespi, Teo, 2002; Crete-Lafreniere et al., 2012). С помощью универсальных праймеров, уже посредством секвенирования аллелей микросателлитных локусов, можно изучить их структуру у разных видов. Данные о структуре микросателлитов могут использоваться для филогенетических исследований, направленных на реконструкцию эволюционного процесса и установления родственных связей между таксонами (Zhao Jun Shao, Rivals et al., 2011; Martin et al., 2001).

Кроме того, сравнительное изучение структуры микросателлитов может внести вклад в понимание сложных мутационных процессов, происходящих в них в ходе эволюции (Taylor et al., 1999; Angers et al., 1997).

Цель работы

Целью данной работы является изучение изменчивости микросателлитных локусов у разных видов рыб семейства *Salmonidae* и применение полученных данных для эволюционных исследований, а также решения прикладных задач идентификации.

Задачи исследования

1. Разработать праймеры для перекрестной амплификации микросателлитов у разных видов лососевых рыб российского Дальнего Востока.
2. Провести фрагментный анализ выбранных нами локусов у исследуемых видов и оценить их полиморфизм.
3. Выявить локусы наиболее подходящие для внутри- и межвидовой идентификации лососевых рыб и проверить их на конкретных примерах.
4. Секвенировать аллели микросателлитных локусов и выявить филогенетические отношения исследуемых видов лососевых рыб по данным маркерам.
5. Определить характер эволюционных изменений в микросателлитных локусах: точковых замен, микросателлитных мутаций, протяженных делеций/инсерций.

Научная новизна работы

Автором впервые разработаны универсальные праймеры, с помощью которых удалось добиться стабильной и качественной амплификации восьми микросателлитных локусов у десяти видов лососевых рыб. Фрагментный анализ разработанных микросателлитов показал заметные различия в уровне полиморфизма и интервалах размеров аллелей между разными видами лососевых рыб.

Впервые продемонстрирована возможность применения данных локусов для решения задач внутри- и межвидовой идентификации, а также идентификации гибридных особей лососевых рыб.

Впервые определены нуклеотидные последовательности восьми микросателлитных локусов, как фланкирующих регионов, так и повторяющихся

последовательностей у десяти видов лососевых рыб. Выявлены заметные различия в структуре микросателлитных локусов, накопившиеся в ходе эволюции лососевых рыб. Впервые проведенный филогенетический анализ данных последовательностей показал монофилию рода *Oncorhynchus* по отношению к родам *Salvelinus*, *Salmo* и *Parahucho*.

Практическая значимость

В последнее время, в связи с ростом воспроизводства, вылова и увеличения продукции лососевых рыб, возникают и будут усиливаться запросы по идентификации биологических образцов. Разработанные нами маркеры оказались полезными для этих целей. На конкретных примерах продемонстрирована возможность применения микросателлитных локусов для внутри- и межвидовой идентификации, а также идентификации гибридов лососевых рыб. Также, ввиду повышенного интереса к изучению популяций лососевых рыб, разработанные микросателлиты оказались востребованы для популяционно-генетических исследований.

Апробация результатов

Основные результаты работы были представлены на международной конференции «Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб» (Санкт-Петербург, 2010), на международной конференции «Проблемы популяционной и общей генетики, посвященной памятной дате – 75-летию со дня рождения академика Ю. П. Алтухова» (Москва, 14-16 ноября 2011), на международной молодежной конференции «Популяционная генетика: Современное состояние и перспективы», посвященной памятной дате – 75-летию со дня рождения Ю.П. Алтухова» (Москва, 17-18 ноября 2011).

Декларация личного участия автора

Автор участвовал в экспедиции по сбору большей части биологического материала данной работы на полуострове Камчатка в 2008 году. Автор самостоятельно проводил выделение ДНК из всех собранных биологических образцов. Автором были разработаны шесть пар праймеров и оптимизированы условия амплификации восьми исследуемых микросателлитных локусов у десяти видов рыб семейства *Salmonidae*. Автором самостоятельно был проведен фрагментный анализ всех микросателлитных локусов у всех исследуемых видов лососевых рыб, а также пробоподготовка ПЦР-продуктов (аллелей) для секвенирования.

Статистическая обработка результатов в программе GDA была проведена совместно с М. В. Шитовой. Автор самостоятельно проводил редактирование, выравнивание и филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей в программах SeqMan, Editseq, Megalign и Mega 5. По результатам данной работы написано 4 статьи, которые приняты в печать и опубликованы в журналах ВАК.

Структура и объем диссертации

Работа, изложенная на 154 страницах (включая 2 приложения на 22 страницах), состоит из введения, обзора литературы, разделов «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение», заключения, выводов, списка сокращений, списка цитированной литературы (включающего 229 источника) и приложений. Работа содержит 23 рисунка и 8 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал. Материалом для данной работы послужили выборки разных видов лососевых рыб, собранные в нескольких регионах российского Дальнего Востока. В исследование были вовлечены семь видов представителей рода *Oncorhynchus* (кета, горбуша, нерка, кижуч, чавыча, сима, микижа), а также представители других родов лососевых рыб, в частности, рода *Salvelinus* - белый голец и кунджа, и рода *Parahucho* - сахалинский таймень (табл. 2.1.).

Помимо популяционных сборов, в работе использован материал по восьми гибридам кеты и горбуши, собранный на забойке Курильского рыбноводного завода (р. Курилка, о. Итуруп) проф. Л.А. Животовским и главным рыбоводом Курильского ЛРЗ В.П. Погодиным 15-22 октября 2011г. Также использовали материал по спектру питания косаток: чешуя и кусочки кожи – собранные с поверхности воды дериваты рыб после удачной охоты косаток сотрудниками кафедры зоологии позвоночных Биолого-почвенного факультета СПбГУ летом 2012 г. в южной части Авачинского залива (Камчатка). Материал был передан нам Татьяной Ивкович для определения видового спектра питания, с разрешением использовать в нашей работе.

В базе данных *Whole-Genome-Shotgun contigs* при помощи *NCBI BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) были обнаружены последовательности микросателлитных локусов *OtsG68*, *Oki10*, *One103*, *One109*, *Ssa197*, *Omm1037*, *Omm1050*, *Oke3* у атлантического лосося – семги *Salmo salar*.

Таблица 2.1. Характеристика исследованных выборок лососевых рыб

Вид	Места сбора биологических проб	Дата сбора(число.месяц.год)	Количество рыб	Сборщик проб
Кета <i>Oncorhynchus keta</i>	Река Камчатка (п-ов Камчатка)	10.08.2008	44	Е.Г. Шайхаев
Нерка <i>O. nerka</i>	---	10-13.08.2008	48	---
Чавыча <i>O. tshawytscha</i>	---	10-13.08.2008	48	---
Микижа <i>O. mykiss</i>	---	10-16.08.2008	48	---
Белый голец <i>Salvelinus albus</i>	---	25-30.08.2008	44	---
Кунджа <i>S. leucomaenis</i>	---	10-13.08.2008	44	---
Кижуч <i>O. kisutch</i>	---	10.08.2008	42	---
Сахалинский таймень <i>Parahucho perryi</i>	Река Даги (о. Сахалин)	21.10.2009	22	А.А. Юрченко Л.А. Животовский
Сима <i>O. masou</i>	Река Знаменка (о. Сахалин)	19.10.2008	44	Л.А. Животовский
Горбуша <i>O. gorbuscha</i>	Река Курилка (о. Итуруп)	27.07.2007	44	Л.К. Фёдорова

- Все сборы проб осуществляли в ходе плановых экспедиционных работ лаборатории (рук. Л.А. Животовский).
- Сборы на р. Камчатка проводили совместно с зав. биостанцией «Радуга» ИБМ ДВО РАН М.Ю. Ковалевым.
- Сборы на р. Даги проводили совместно с экспедицией от АНО «Сахалинская лососевая инициатива» (зав. С.Ю. Диденко) под руководством А.Ю. Семенченко и Д.Л. Диденко. Брли прижизненные пробы (кусочек плавника) с последующим выпуском рыб в водоем.

Анализ ДНК. Выделение ДНК проводили из соединительной ткани плавника рыбы, при помощи набора «Diatom DNA prep 200», ООО «Лаборатория Изоген», согласно прилагаемой инструкции.

В базе данных *NCBI nucleotide* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) изначально было выбрано 14 микросателлитных локусов, обнаруженных у разных видов лососевых рыб: *OtsG68* (Williamson et al., 2002), *OtsG85* (Williamson et al., 2002), *Ots102* (Nelson, Beachem, 1998), *Ots 211* (Nelson, Beachem, 1998), *One103* (Olsen et al., 2000), *One109* (Olsen et al., 2000), *OMM1037* (Rexroad III et al., 2002), *OMM1050* (Rexroad III et al., 2002), *OMM1121* (Rexroad III et al., 2002), *OMM1070* (Rexroad III et al., 2002), *Oki10* (Smith et al., 1998), *Oki2* (Smith et al., 1998), *Ssa197* (O'Reilly et al., 1997), *Sco200* (DeHaan, Ardren, 2005). Для них подбирались известные или конструировались новые праймеры с целью перекрестной амплификации у всех изучаемых нами видов. Также использовались данные, полученные по локусу *Oke3*. Для его амплификации у разных видов лососевых рыб, а также последующего секвенирования полученных аллелей, пришлось прибегнуть ко многим вариантам праймеров, представленных в диссертационной работе С.Ю. Кордичевой (2011).

Для проведения ПЦР-амплификации использовали набор реагентов «GenPak PCR Core» ООО «Лаборатория Изоген», содержащий ингибированную для «горячего старта» *Taq* ДНК полимеразу, дезоксинуклеозид трифосфаты и хлорид магния с конечными концентрациями, соответственно, 1u, 200 μM и 2,5 mM, а также оптимизированную буферную систему для проведения ПЦР. Конечный объем ПЦР-смеси 20 мкл, конечная концентрация праймеров в реакции 0,1-0,5 μM, количество ДНК 20-100 нг. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «Applied Biosystems 9800 Fast Thermal Cycler». Программа амплификации включала в себя следующие стадии: 1) предварительная денатурация при 95°C – 1 мин, 2) 32 цикла: 95°C-20 сек, 56-58°C-20 сек, 74°C-30 сек, 3) заключительный синтез при 74°C-2 мин.

Фрагментный анализ проводили на приборе для капиллярного электрофореза QIAxcel фирмы QIAGEN®, размеры аллелей определяли на основании набора фрагментов ДНК, имеющих размер от 76 п.н до 556 п.н с шагом 24 п.н, используя программное обеспечение BioCalculator software фирмы QIAGEN®.

Для анализа нуклеотидных последовательностей исследуемых локусов, проводили разделение их аллелей в 2%-агарозном геле в 1x TBE буфере, а также в блоке 6 или 8% неденатурирующего полиакриламидного геля в 0,5x TBE. Для элюции ПЦР-продуктов использовали набор «Diatom DNA elution» ООО «Лаборатория Изоген» согласно прилагаемой инструкции. Реамплификацию элюированных ПЦР-продуктов проводили при помощи набора «GenPak PCR Core» ООО «Лаборатория Изоген».

Очистка и секвенирование ПЦР-продуктов осуществлялась в компаниях ООО «Синтол» и ЦКП ОБН РАН «Генетический полиморфизм», используя те же варианты праймеров, что и для амплификации.

Анализ генетических данных. Статистический анализ данных проводили согласно руководству Weir (1996) с использованием пакета программ GDA (Lewis, Zaykin, 2001). В качестве мер внутривидовой изменчивости рассматривали индекс разнообразия (ожидаемая гетерозиготность): $H = \frac{2n}{2n-1} \sum p_i^2$ (где p_i – это частоты аллелей, а n – объем выборки), наблюдаемое число аллелей, а также число аллелей с поправкой на минимальный объем исследованных образцов (rarefaction method, Krebs 1999). Для оценки идентифицирующей способности маркеров определяли вероятность P_c случайного совпадения генотипов двух произвольно взятых особей, которую вычисляли как сумму квадратов частот генотипов в выборке по данным о частотах аллелей в предположении генотипического равновесия (соотношений Харди-Вайнберга): чем меньше величина вероятности, тем надёжнее идентификация. Значимость отклонений от соотношений Харди-Вайнберга проверяли точным критерием Фишера методом пермутаций (Guo, Thompson 1992, Zaykin et al. 1995), с последующим учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения (Weir, 1996).

Для анализа полученных хроматограмм и редактирования последовательностей использовались программы Seqman, EditSeq пакета Lasergene фирмы DNASTAR. Для выравнивания отредактированных нуклеотидных последовательностей использовались программа MegAlign пакета Lasergene фирмы DNASTAR.

Построение филогенетических деревьев проводили в программе Mega 5 используя дистанционные методы построения филогенетических деревьев: метод присоединения соседей – NJ (Neighbor-joining method) и метод минимума эволюции – ME (minimum evolution), а также методы анализа дискретных признаков: метод максимального правдоподобия – ML (maximum likelihood) и метод максимальной экономии MP (maximum parsimony). Длина анализируемого фрагмента 482 п.н. В качестве эволюционной модели использовалась 2-параметрическая модель Кимуры. Статистическая обработка полученных деревьев оценивалась с помощью «бутстреп» - анализа путем построения 1000 альтернативных деревьев.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Перекрестная амплификация микросателлитных локусов лососевых рыб

Используя разные варианты праймеров – как ранее опубликованные, так и разработанные нами, удалось добиться стабильной и качественной амплификации восьми микросателлитных локусов у всех исследованных в работе видов

лососевых рыб, при практически одинаковых условиях (табл. 3.1.). Семь из восьми микросателлитных локусов, кроме локуса *Oki10* у гольца, амплифицировались у всех исследуемых видов при помощи одних и тех же праймеров. Для амплификации локуса *Oki10* у *Salvelinus albus* использовали дополнительную пару праймеров.

Сравнительное изучение полиморфизма микросателлитных локусов

В табл. 3.2. и на рис. 3.1. представлены данные о полиморфизме исследованных нами микросателлитных локусов у изученных видов семейства *Salmonidae*. Полиморфизм, а также интервалы размеров аллелей исследуемых локусов у разных видов лососевых рыб проявляются по-разному. Некоторые локусы сохраняют высокий уровень аллельного полиморфизма у всех исследованных видов. В то же время полиморфизм, а также интервалы размеров аллелей в зависимости от видов могут заметно отличаться: локусы, проявляющие себя как полиморфные у одного вида, у других филогенетически близких видов проявляют себя как мономорфные.

Таблица 3.1. Характеристика исследованных микросателлитных локусов

Локус	Повторяющаяся последовательность	Праймеры	T°C отжига
<i>OtsG68</i>	(TAGA) _n	F: 5'-tatgaactgcagctgttatgtagttg-3' ** R: 5'-catgtcggctgctcaatgtataa-3' **	58
<i>Ots102</i>	(GCCT) _n (GTCT) _n	F: 5'-ggatccaataaggagtgatatagtag-3' ** R: 5'-tateccctttaccattcccttgcta-3' **	58
<i>One103</i>	(ATCT) _n N _n (ATCT) _n	F: 5'-aatgttgagagctatttcaatcc-3' * R: 5'-gattgatgaatgggtggg-3' *	56
<i>One109</i>	(TAGA) _n	F: 5'-gagagggagagagtgtctttg-3' ** R: 5'-gtagcatcagctcactaatgggat-3' **	58
<i>OMM1037</i>	(GAAA) _n	F: 5'-gaacggcgactggatttaataact-3' ** R: 5'-ccgctcaccctcgtctcttaa-3' **	58
<i>OMM1050</i>	(GATA) _n N _n (GATA) _n N _n (GATA) _n	F: 5'-accaacctgaacacagcctaact-3' ** R: 5'-gctgtaacatttcaggatcat-3' **	58
<i>Oki10</i>	(CTGT) _n	F ₁ : 5'-gagtctggacagattggatt-3' ** R ₁ : 5'-gggagctacagctttttacaatc-3' ** F ₂ : 5'-tccaaactcgtgttcgttgata-3' ** R ₂ : 5'-cacataggggagctacagcttt-3' **	58
<i>Ssa197</i>	(TG) _n (TGAG) _n	F: 5'-gggttgagttagggaggcttg-3' * R: 5'-tggcagggatttgacataac-3' *	58

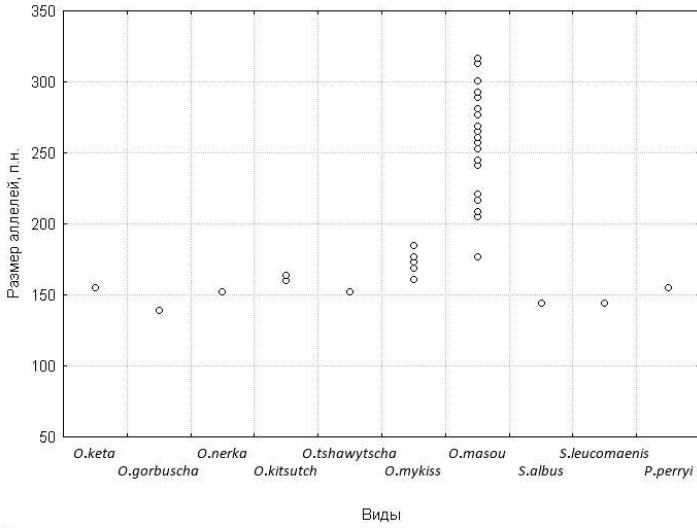
** - праймеры разработанные в данном исследовании; * - праймеры, заимствованные из первоисточника.

Таблица 3.2. Аллельное разнообразие (*A* – наблюдаемое число аллелей, *Ar* – число аллелей с поправкой на минимальное число образцов, *He* – ожидаемая гетерозиготность) исследованных маркеров.

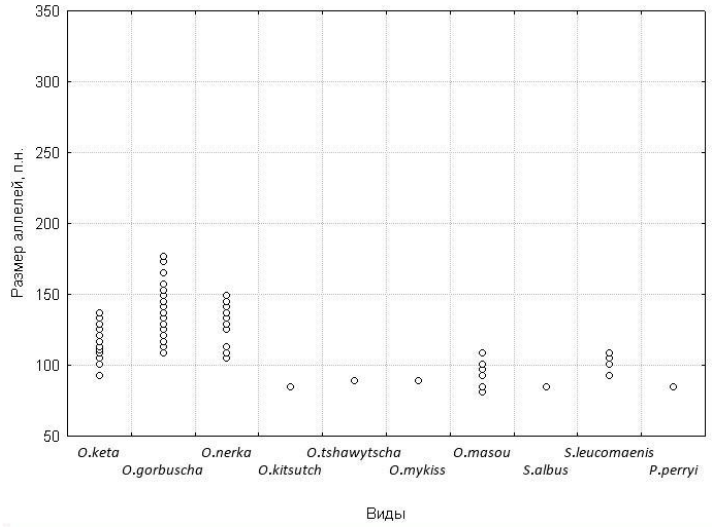
Вид	Разнообразие	Локус								В среднем на локус
		<i>OMM1050</i>	<i>One109</i>	<i>Ssa197</i>	<i>One103</i>	<i>OMM1037</i>	<i>Ots102</i>	<i>OtsG68</i>	<i>Oki10</i>	
Кета	<i>A</i>	1	11	4	7	3	5	21	21	9.8
	<i>Ar</i>	1.0	9.5	3.7	6.4	2.9	4.5	17.0	17.5	8.1
	<i>He</i>	0	0.85	0.54	0.80	0.54	0.56	0.93	0.94	0.65
Горбуша	<i>A</i>	1	16	16	21	4	25	18	22	15.5
	<i>Ar</i>	1.0	14.0	13.7	18.7	4.0	21.1	14.2	19.2	13.3
	<i>He</i>	0	0.92	0.91	0.95	0.65	0.95	0.90	0.93	0.78
Нерка	<i>A</i>	1	10	1	11	3	1	3	16	5.8
	<i>Ar</i>	1.0	8.8	1.0	10.1	2.9	1.0	2.6	15.0	5.3
	<i>He</i>	0	0.84	0	0.84	0.22	0	0.51	0.92	0.42
Кижуч	<i>A</i>	2	1	1	2	2	1	13	17	4.9
	<i>Ar</i>	2.0	1.0	1.0	2.0	1.5	1.0	12.9	15.0	4.6
	<i>He</i>	0.28	0	0	0.33	0.02	0	0.90	0.92	0.31
Чавыча	<i>A</i>	1	1	28	3	3	22	15	25	12.4
	<i>Ar</i>	1.0	1.0	21.1	2.7	2.7	18.1	13.3	19.6	10.0
	<i>He</i>	0	0	0.95	0.50	0.20	0.95	0.91	0.94	0.56
Сима	<i>A</i>	19	6	10	9	9	4	17	20	11.8
	<i>Ar</i>	15.8	4.9	8.8	7.4	7.2	3.4	13.2	16.7	9.7
	<i>He</i>	0.92	0.69	0.84	0.76	0.75	0.38	0.91	0.94	0.77
Микижа	<i>A</i>	5	1	2	2	10	4	5	7	4.5
	<i>Ar</i>	4.9	1.0	2.0	2.0	9.1	3.8	4.9	6.2	4.2
	<i>He</i>	0.70	0	0.49	0.51	0.84	0.45	0.67	0.76	0.55
Кунджа	<i>A</i>	1	4	5	1	1	8	12	13	5.6
	<i>Ar</i>	1.0	3.8	4.5	1.0	1.0	6.1	11.0	10.9	4.9
	<i>He</i>	0	0.51	0.61	0	0	0.67	0.88	0.88	0.44
Б. голец	<i>A</i>	1	1	1	2	5	31	10	23	9.5
	<i>Ar</i>	1.0	1.0	1.0	1.9	4.5	22.2	7.7	18.1	7.3
	<i>He</i>	0	0	0	0.09	0.69	0.94	0.55	0.94	0.40
С. таймень	<i>A</i>	1	1	1	1	11	4	1	8	3.5
	<i>Ar</i>	1.0	1.0	1.0	1.0	11.0	4.0	1.0	8.0	3.5
	<i>He</i>	0	0	0	0	0.87	0.66	0	0.83	0.30
Среднее	<i>A</i>	3.3	5.2	6.9	5.9	5.1	10.5	11.5	17.2	
	<i>Ar</i>	3.0	4.6	5.8	5.3	4.7	8.5	9.8	14.6	
	<i>He</i>	0.19	0.38	0.43	0.48	0.48	0.56	0.72	0.90	

Примечание. Для оценки числа аллелей по *rarefaction*-методу (*Ar*) минимальное число образцов взяли равным 21 (количество исследованных проб по локусу *OMM1037* у тайменя).

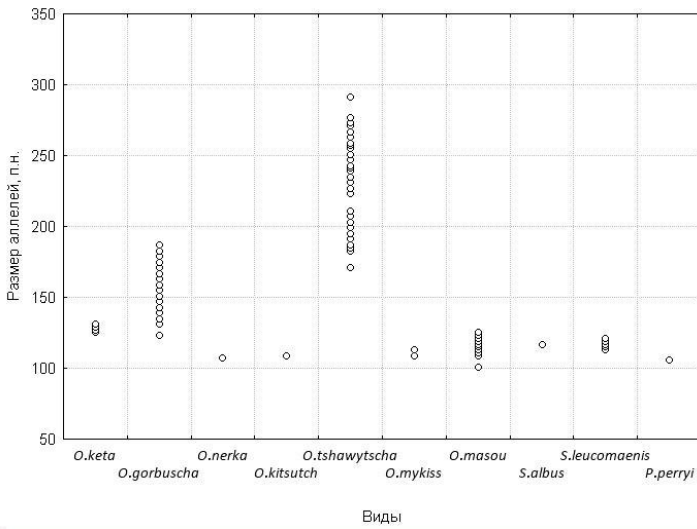
OMM1050



One109



Ssa197



OMM1037

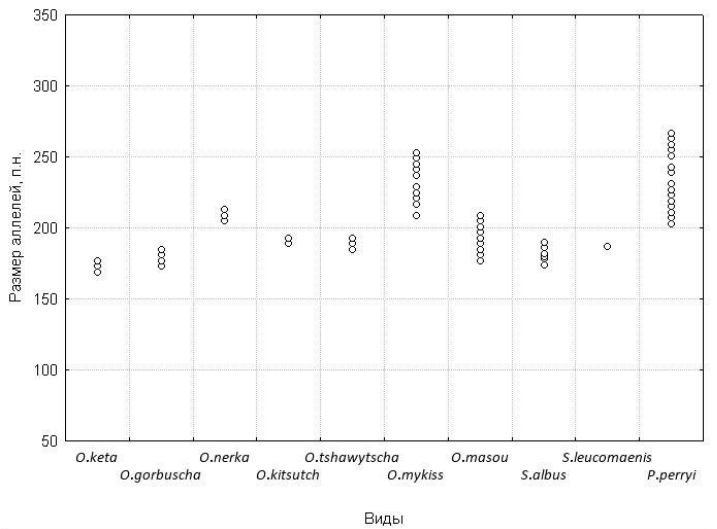
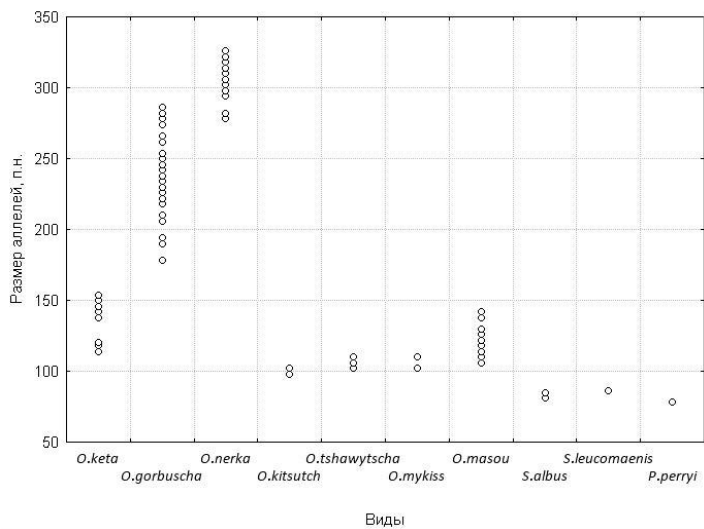
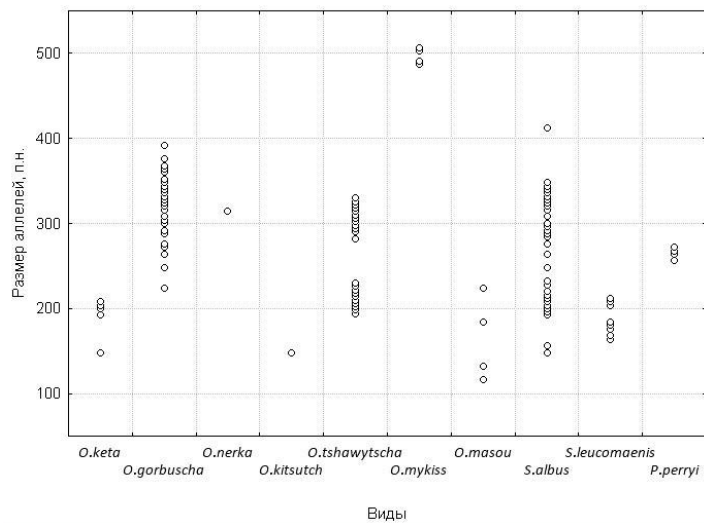


Рисунок 3.1. Полиморфизм и интервал размеров аллелей микросателлитных локусов лососевых рыб

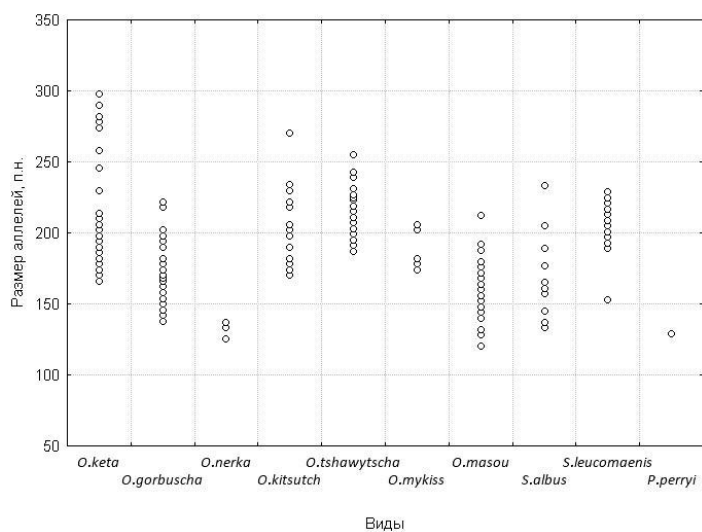
One103



Ots102



OtsG68



Oki10

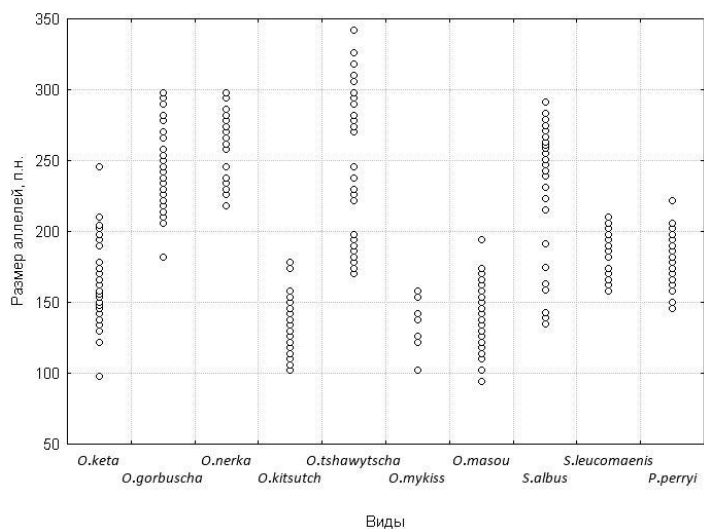


Рисунок 3.1. (Продолжение) Полиморфизм и интервал размеров аллелей микросателлитных локусов лососевых рыб.

Идентификация лососевых рыб с помощью разработанных микросателлитов

Исследованные нами локусы и обнаруженные по ним различия в полиморфизме оказались в определенном смысле «оптимальными» для идентификации лососевых рыб: на их основе можно проводить определение видовой принадлежности, идентификацию образцов на внутривидовом уровне и использовать для популяционно-генетических исследований.

Для видовой идентификации хорошо подходят маркеры с минимальной внутривидовой изменчивостью, особенно мономорфные – как, например, локус *ОММ1050*: с его помощью однозначно различаются виды для большинства попарных сравнений (*табл. 3.3. и 3.4.*). В частности, локус *ОММ1050* разделяет все виды тихоокеанских лососей, кроме нерки и чавычи, которые в исследованных выборках оказались мономорфными по идентичному аллелю.

Однозначные межвидовые различия имеются не только по локусам с малой внутривидовой изменчивостью, но и по локусам с хорошо выраженным внутривидовым полиморфизмом, так что в целом в исследованных выборках каждая пара видов различалась по трем или более маркерам (*табл. 3.4.*). Например, нерка и чавыча взаимоисключаются по пяти локусам, а кижуч и нерка – по всем исследованным маркерам. Эти данные были успешно применены для конкретных практических целей, в частности для идентификации видового спектра лососей в пище тихоокеанских косаток, а так же для идентификации гибридов лососевых рыб.

Наличие полиморфных маркеров позволяет провести внутривидовую идентификацию биологических образцов. Например, можно рассмотреть возможность индивидуализации – ответить на вопрос происходит ли тестируемый биологический образец от данной рыбы или получены ли разные биологические образцы от одной и той же особи. Если два биологических образца имеют различные генотипы хотя бы по одному полиморфному маркеру, то они, очевидно, принадлежат разным особям. Напротив, доказательство индивидуальной идентичности биологических образцов не является 100%-м, даже если их генотипы совпадают по всем исследованным локусам и потому дается в виде вероятностей возможных версий. Одной из мер способности маркеров индивидуализировать образцы может быть вероятность P_c случайного совпадения генотипов двух произвольно выбранных особей. Вероятность эта тем меньше, чем выше полиморфизм идентифицирующих локусов. Для исследованных нами маркеров идентифицирующая способность удовлетворительна для индивидуализации биологических образцов для каждого из исследованных нами видов (*табл. 3.6*), поскольку вероятность P_c оказалась достаточно малой даже для тайменя, чья внутривидовая изменчивость невелика (*табл. 3.2*).

Таблица 3.3. Пределы вариабельности размеров аллелей в исследованных выборках (минимальные/максимальные размеры аллелей в числе нуклеотидных пар)

Вид	Локусы							
	<i>OMM1050</i>	<i>One109</i>	<i>Ssa197</i>	<i>One103</i>	<i>OMM1037</i>	<i>Ots102</i>	<i>OtsG68</i>	<i>Oki10</i>
<i>O. keta</i>	155	93/137	125/131	114/154	169/177	148/208	166/298	98/246
<i>O. gorbuscha</i>	139	109/177	123/187	178/286	173/185	224/392	138/222	182/298
<i>O. nerka</i>	152	105/149	107	278/326	205/213	314	125/137	218/298
<i>O. kisutch</i>	160/164	85	109	98/102	189/193	148	170/270	102/178
<i>O. tshawytscha</i>	152	89	171/291	102/110	185/193	194/330	187/255	170/342
<i>O. masou</i>	177/317	81/109	101/125	106/142	177/209	116/224	120/212	94/194
<i>O. mykiss</i>	161/185	89	109/113	102/110	209/253	487/507	174/206	102/158
<i>S. leucomaenis</i>	144	93/109	113/121	86	187	164/212	153/229	158/210
<i>S. albus</i>	144	85	117	81/85	174/190	148/412	133/233	135/291
<i>P. perryi</i>	155	85	106	78	203/255	256/272	129	146/186

Примечание 1. Мономорфные локусы указаны размером единственного обнаруженного аллеля в исследованной выборке.

Примечание 2. Основная внутривидовая изменчивость основана на различиях между размерами аллелей кратными четырем парам нуклеотидов во всех локусах, кроме *Ssa197*. В этом локусе тетра-нуклеотидные различия изменчивость наблюдалась у горбуши и микижи, а динуклеотидные – у кеты, симы и кунджи; у чавычи аллельная изменчивость по локусу *Ssa197* комплексная: как с тетра-, так и с динуклеотидными различиями в размерах аллелей.

Таблица 3.4. Локусы, по которым сравниваемые пары видов однозначно различались в исследованных выборках.

	<i>O. keta</i>	<i>O. gorbuscha</i>	<i>O. nerka</i>	<i>O. kisutch</i>	<i>O. tshawytscha</i>	<i>O. masou</i>	<i>O. mykiss</i>	<i>S. leucomaenis</i>	<i>S. albus</i>
<i>O. gorbuscha</i>	146*								
<i>O. nerka</i>	134567	13567							
<i>O. kisutch</i>	12345	1234568	12345678						
<i>O. tshawytscha</i>	1234567	12467	23457	12367					
<i>O. masou</i>	167	1478	134678	1467	12367				
<i>O. mykissa</i>	123456	1234568	1234678	1256	135678	267			
<i>S. leucomaenis</i>	13457	134567	1345678	1234567	1234567	1457	124567		
<i>S. albus</i>	1234578	1234578	1234568	134578	12345678	145678	12345678	2458	
<i>P. perryi</i>	234567	123457	12345678	134567	1234567	134567	1234567	1234567	134578

* означает, что данная пара видов взаимно исключаются по локусам *Omm1050*, *One103* и *Ots102*, закодированным как 1, 4 и 6; кодировка локусов: *OMM1050* (1), *One109* (2), *Ssa197* (3), *One103* (4), *OMM1037* (5), *Ots102* (6), *OtsG68* (7), *Oki10* (8).

Разработанные нами универсальные праймеры и полученные результаты уже имеют непосредственное применение для решения популяционно-генетических проблем. В частности, с целью повышения точности популяционной идентификации кеты, помимо ранее разработанных десяти микросателлитных локусов, оказались востребованными изученные нами локусы *OMM1037*, *Ots102* и *Oki10* (Афанасьев и др., 2011). Эти же локусы были использованы для популяционных исследований сахалинского тайменя (Шитова и др. 2012). В настоящее время исследованные нами микросателлиты привлечены также для широких популяционно-генетических исследований и других видов лососевых рыб – нерки (Рубцова и др. 2013) и кунджи (Афанасьев и др. 2013). В будущих исследованиях важным шагом в развитии изученных нами маркеров в целях популяционных приложений является расширение географии выборок для более полного охвата видового спектра аллелей и оценки частот редких и частых аллелей в популяциях лососевых рыб.

Таблица 3.6. Идентифицирующая способность исследованных микросателлитных маркеров (P_c)

Вид	P_c	Вид	P_c
<i>O. keta</i>	$1.0 \cdot 10^{-8}$	<i>O. masou</i>	$8.9 \cdot 10^{-11}$
<i>O. gorbuscha</i>	$7.9 \cdot 10^{-13}$	<i>O. mykiss</i>	$5.7 \cdot 10^{-6}$
<i>O. nerka</i>	$9.2 \cdot 10^{-6}$	<i>S. leucomaenis</i>	$1.1 \cdot 10^{-5}$
<i>O. kisutch</i>	$9.3 \cdot 10^{-5}$	<i>S. albus</i>	$2.1 \cdot 10^{-6}$
<i>O. tshawytscha</i>	$2.2 \cdot 10^{-9}$	<i>P. perryi</i>	$4.4 \cdot 10^{-4}$

Эволюция микросателлитных локусов лососевых рыб

Посредством прямого секвенирования аллелей данных микросателлитов у исследуемых видов, были выявлены значительные различия в их структуре. Наши исследования подтверждают, что эволюция микросателлитов – это сложный комплексный процесс, включающий в себя, помимо микросателлитных мутаций, также точковые мутации и протяженные делеции и инсерции.

При сравнении структуры локуса *One103* у молодых видов рода *Oncorhynchus*, таких как горбуша и нерка с сахалинским тайменем (род *Parahucho*), который является наиболее древним среди исследуемых видов видно, что в ходе эволюции происходит развитие микросателлита от простой короткой



Рисунок 3.2. Эволюция микросателлитных локусов лососевых рыб (Данные о топологии и направлении эволюции лососевых рыб заимствованы из исследований (Crespi, Fulton, 2003)).

последовательности, содержащей небольшое количество повторов, до более сложного микросателлита, имеющего высокий уровень полиморфизма (рис. 3.2., б).

На примере локуса *OMM1037* видно, что напротив более древние эволюционные линии содержат более длинные совершенные повторы, а благодаря накопившимся по ходу эволюционного процесса точковым мутациям происходит деградация или полная утрата повторяющейся последовательности у более молодых видов (рис. 3.2., в). Таким образом, в работе наглядно продемонстрирована предложенная некоторыми авторами концепция жизненного цикла микросателлита от его «рождения» до полной деградации («смерти»).

Структура некоторых локусов по ходу эволюционного процесса практически не претерпевает никаких изменений, например это касается локуса *One109* (рис. 3.2., а). Интересно, что несмотря на отсутствие точковых мутаций, как основного фактора лимитирующего рост количества повторов, полиморфизм локуса по количеству повторов в зависимости от вида демонстрирует существенные различия.

Филогенетический анализ микросателлитных локусов лососевых рыб

Кроме упомянутых мутационных изменений в самих микросателлитах, также в достаточном количестве обнаружены информативные для филогенетического анализа единичные нуклеотидные замены в уникальных фланкирующих регионах. Используя дистанционные методы построения филогенетических деревьев, а также методы анализа дискретных признаков были рассмотрены различные варианты топологии исследованных видов (Рис. 3.3. - 3.4.).

Наши исследования показывают, что среди исследованных нами видов, представители рода *Oncorhynchus* образуют отдельную монофилетическую группу по отношению к представителям родов *Salvelinus*, *Salmo*, *Parahucho*. Однако, согласно многим данным, полученным на основании филогенетического анализа различных нуклеотидных последовательностей митохондриальной и ядерной ДНК, род *Oncorhynchus* был объединен в одну группу с родом *Salvelinus* (Crespi, Fulton, 2003, Crete-Lafreniere et al., 2012). Полученные же нами данные совпадают с данными анализа морфологических и кариологических признаков (Глубоковский, 1995, Викторовский и др., 1985).

Внутри рода *Oncorhynchus* расположение видов кета горбуша и нерка, а также чавычи и кижуча соответствует общим представлениям о топологии рода *Oncorhynchus*. Что же касается позиции симы, то она располагается ближе к эволюционной линии, в состав которой входит микижа, что соответствует данным, полученным на основании филогенетического анализа ядерной и митохондриальной ДНК (Crespi, Fulton, 2003).

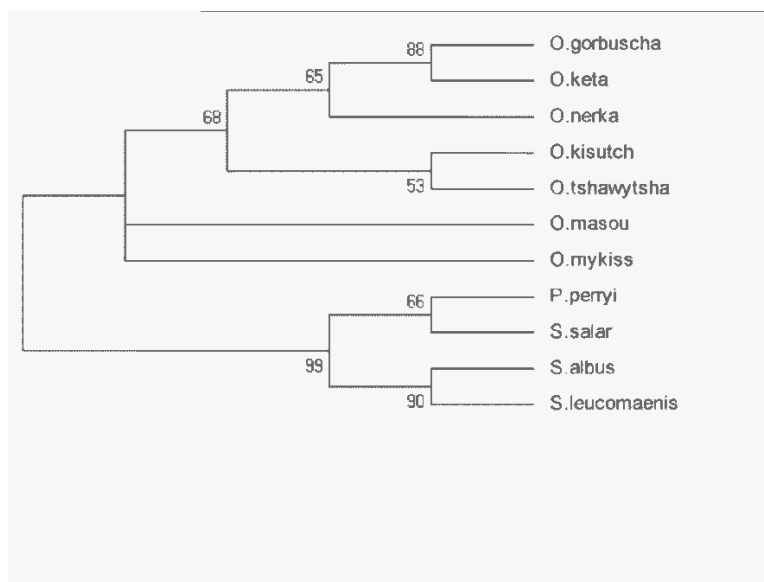


Рисунок 3.3. Филогенетическое дерево, построенное с помощью метода максимального правдоподобия (ML - maximum likelihood). Эволюционные расстояния определены по модели Кимуры. Цифрами обозначены результаты “bootstrap”-анализа (значимыми признаются значения больше 50).

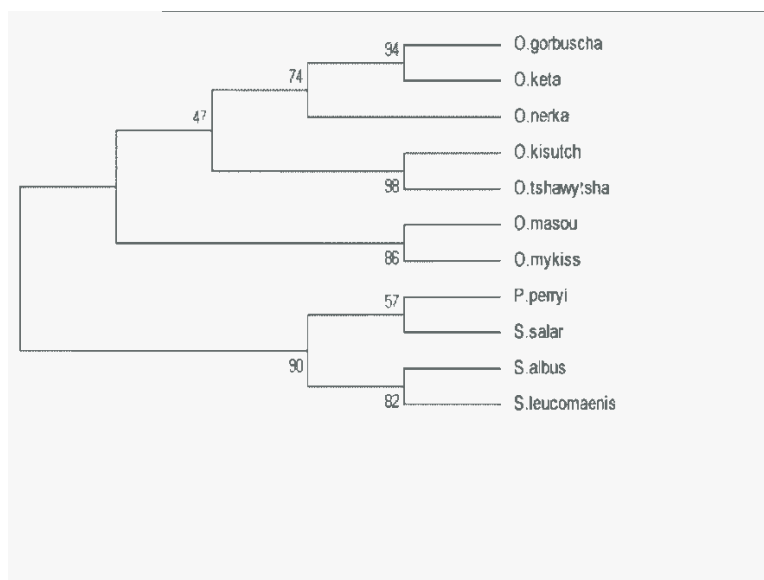


Рисунок 3.4. Филогенетическое дерево, построенное с помощью метода присоединения соседей (NJ - Neighbor-joining method). Эволюционные расстояния определены по модели Кимуры. Цифрами обозначены результаты “bootstrap”-анализа (значимыми признаются значения больше 50).

ВЫВОДЫ

1. Разработаны универсальные праймеры, с помощью которых надежно амплифицируются восемь микросателлитных локусов у лососевых рыб родов *Oncorhynchus*, *Salvelinus*, *Parahucho* семейства *Salmonidae*. Уровень полиморфизма и интервал размеров аллелей данных микросателлитов значительно варьируют среди исследованных видов.

2. Обнаруженные межвидовые различия и уровень внутривидового полиморфизма по исследованным микросателлитным локусам позволяют решать задачи внутри- и межвидовой идентификации лососевых рыб.

3. Определены нуклеотидные последовательности изученных микросателлитных локусов, как повторов, так и фланкирующих регионов у видов семейства *Salmonidae*. Их филогенетический анализ показал четкую монофилию рода *Oncorhynchus* по отношению к родам *Salvelinus*, *Salmo* и *Parahucho*.

4. Филогенетический анализ внутри рода *Oncorhynchus* выявил общеизвестную триаду «кета-горбуша-нерка», к которой примыкает кластер «чавыча-кижуч», что соответствует общим представлениям о топологии рода *Oncorhynchus*. Однако, в отличие от ряда других ДНК-исследований, наши данные показали, что сима располагается ближе к микиже, образуя вместе с ней более далекий кластер.

5. Структура микросателлитов значительно различается даже у филогенетически близких видов. Эволюция микросателлитов представляет собой сложный ненаправленный процесс: совокупность микросателлитных мутаций, точковых замещений и протяженных делеций/инсерций, приводящих как к образованию новых типов повторов, так и к деградации и возможной утрате микросателлитов.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Животовский Л.А., **Е.Г. Шайхаев**, М.В. Шитова. (2013) Идентификация биологических образцов лососевых рыб по микросателлитным маркерам с использованием идентичного набора ПЦР-праймеров // Биология моря. 39, №6.
2. Шитова М.В., А.А. Юрченко, **Е.Г. Шайхаев**, Л.А. Животовский. (2012) панель микросателлитных локусов для популяционных исследований сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort). Генетика 48: 976-982.
3. Афанасьев П.К., Г.А. Рубцова, М.В. Шитова, **Е.Г. Шайхаев**, и Л.А. Животовский. (2011) Расширение набора микросателлитных маркеров с целью повышения точности идентификации кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) // Генетика 47: 1473-1480.
4. Афанасьев К.И., Г.А. Рубцова, **Е.Г. Шайхаев**, Л.А. Животовский. (2013) Микросателлитная изменчивость кунджи *Salvelinus leucomaenis* Сахалинской области // Генетика 49: 1088-1092
5. Животовский Л.А., Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Шитова М.В., Малинина Т.В., Прохоровская В.Д., Ракицкая Т.А., Кордичева С.Ю., Афанасьев П.К., **Шайхаев Е.Г.**, Юрченко А.А., Тетерина А.А. Исследования популяционной структуры лососевых рыб Дальнего Востока: фундаментальные и прикладные аспекты. 64-65 с. Проблемы популяционной и общей генетики. Материалы международной конференции, посвященной памятной дате – 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова. 14-16 ноября 2011, Москва, Россия.- М.: Цифровичок, 2011. 212-213.
6. **Шайхаев Е.Г.** Сравнительное изучение полиморфизма микросателлитных локусов тихоокеанских лососей // Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб. Тезисы докладов Международной конференции. – СПб. : Нестор-История, 2010. 235– 236 с.
7. **Шайхаев Е.Г.** Эволюция микросателлитных локусов лососевых рыб // Популяционная генетика: современное состояние и перспективы. Материалы международной молодежной конференции, посвященной памятной дате – 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова. 17-18 ноября 2011, Москва, Россия.- М.: Цифровичок, 2011. 212-213.