

УДК 575.174.015.3:597.5

## МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КУНДЖИ *Salvelinus leucomaenis* САХАЛИНСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2013 г. К. И. Афанасьев, Г. А. Рубцова, Е. Г. Шайхаев, Л. А. Животовский

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991

e-mail: levazh@gmail.com

Поступила в редакцию 14.01.2013 г.

Разработана панель 12 полиморфных микросателлитных маркеров для популяционно-генетических исследований кунджи *Salvelinus leucomaenis*. Исследованы четыре выборки, каждая объемом 48 особей, из географически различных мест: островов Сахалин, Кунашир и Итуруп (2 выборки). Общее число различных по размерам аллелей в разных локусах варьировало от 2 до 31. Аллельное разнообразие и ожидаемая гетерозиготность популяции кунджи с сильным антропогенным давлением оказались ниже, чем для диких популяций этого вида. Выявлена значительная генетическая подразделенность различных островных популяций кунджи, соответствующая модели изоляции расстоянием.

DOI: 10.7868/S0016675813090026

Кунджа *Salvelinus leucomaenis* (Pallas) — вид гольцов, обитающий в азиатской части бассейна Тихого океана. Его ареал включает бассейны Охотского и северной части Японского морей, а также азиатское побережье Тихого океана на юг от Олюторского залива до о-ва Хонсю [1]. Таксономическое положение, феноетическое разнообразие и основные особенности биологии этого вида подробно рассматриваются в обзоре Савваитовой с соавт. [2]. Отмечается, что хотя, по сравнению с другими видами гольцов кунджа характеризуется меньшим морфологическим и экологическим разнообразием, у нее встречаются почти все известные для гольцов внутривидовые формы. Все это дает основание предполагать наличие внутривидовой генетической дифференциации этого вида. И действительно, в ряде работ японских исследователей была показана географическая изменчивость гемоглобина, изотимов и митохондриальной ДНК кунджи [3–5]. Однако, учитывая то, что в настоящее время при установлении популяционно-генетической структуры наиболее информативны микросателлиты [6–8], представляется интересным изучить генетическую дифференциацию кунджи с использованием именно этих маркеров. Начало работ по микросателлитной изменчивости этого вида положено японскими исследователями, изучившими кунджу Японских островов по пяти локусам [9]. Популяции кунджи, приуроченные к российской части ареала, остаются совершенно неизученными. Кроме того, важно вовлечь в анализ большее число маркеров в целях увеличения разрешающей способности и идентификационной мощно-

сти популяционного исследования. Целью нашей работы явилась разработка системы микросателлитных маркеров для исследования популяционной структуры кунджи, обитающей на территории России, и анализ ряда выборок в целях оценки внутри- и межпопуляционной изменчивости этого вида.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе проанализировано 192 образца из четырех популяций кунджи различных водоемов Сахалинской области: р. Виахту (северо-западный Сахалин, июнь–июль 2010 г., производители), оз. Валентины (о. Кунашир, 14–15 октября 2010 г., производители), оз. Благодатное (о. Итуруп, 14 октября 2008 г., производители), руч. Курильский (приток р. Курилка, о. Итуруп, 2 июля 2009 г., молодь) (рис. 1). Из каждой выборки было взято для ДНК-анализа по 48 образцов.

Для исследования были подобраны 12 микросателлитных локусов, из которых три (*Sle4*, *Sle5*, *Sle6*) разработаны именно для кунджи [9], а девять локусов были ранее описаны для других видов лососевых рыб (табл. 1).

Используемая нами методика генотипирования микросателлитных локусов требует небольших размеров амплифицируемых фрагментов ДНК (не превышающих 250 пн), поэтому для пяти локусов с большими размерами аллелей были сконструированы новые праймеры, позволившие

уменьшить размеры ПЦР-продукта (в табл. 1 эти локусы помечены звездочками):

|                 |                                                                |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|
| <i>One109</i>   | F : GAGAGGGAGAGAGTGTCTTTG<br>R : GTAGCATCAGCTCACTAATGGGATAATA; |
| <i>Sle6</i>     | F : TTTCATGATATTTGGAGGCACTGAT<br>R : CCCTGTGACAGTGTGTCTAGTAA;  |
| <i>Sle5</i>     | F : GATGCCAGCACTGAGGTTGAAT<br>R : CGAAATAAAGGGTGAAGGGAGTAA;    |
| <i>Sle4</i>     | F : ACAAGACAGGGGGCACACTAAT<br>R : ATCATGCAGAGCAGAGGGTTCTTA;    |
| <i>SnaMSU01</i> | F : AACACAAAGTGTCTAGGTGAC<br>R : AACAGGTGTCTAGAGCATGTGT.       |

Образцы ткани для ДНК-анализа (небольшой кусочек грудного плавника) фиксировали в 96%-ном этаноле. Выделение тотальной ДНК проводили стандартным методом с использованием набора реагентов Diatom DNA Prep 200 фирмы “ИзоГен” (Россия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе MJ Research PTC-100 с использованием готовых лиофилизированных смесей для ПЦР Gene Pak PCR Core фирмы “ИзоГен” (Россия) с добавлением 5 мкл смеси праймеров (конечная концентрация 0.5 мкМ) и 5 мкл геномной ДНК (100 нг). Продукты амплификации фракционировали с помощью электрофореза в 6%-ном неденатурирующем полиакриламидном геле в  $0.5 \times$  TBE буфере при напряжении 300 В в течение 2–5 ч. Полученные фореграммы окрашивали бромистым этидием и документировали в ультрафиолетовом свете. В качестве маркеров длин фрагментов использовали ДНК плазмиды pBR322, обработанные рестриктазами *Hae*III и *Hpa*II. Размеры аллелей по каждому локусу определяли с использованием программы 1D Image Analysis Software Version 3.5 фирмы “Кодак” (США).

Для оценки аллельной изменчивости, индекса фиксации, уровня значимости  $p$  при тестировании соответствия распределению Харди–Вайнберга и расчета коэффициентов попарного сходства популяций  $\theta$  (оценки  $F_{ST}$ -статистики) использовали программу GDA (Lewis, Zaykin, 2001) в соответствии с руководством Вейра (Weir, 1996).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследованные нами микросателлитные локусы кунджи оказались полиморфными: число различных по размеру аллелей в объединенных выборках варьировало от 2 (в локусах *Smm21* и *Ssa20.19*) до 31 в локусе *Sle4* (табл. 2). Некоторые локусы с небольшим числом аллелей оказались мономорфными в ряде выборок (табл. 2). Распределение частот генотипов находится в равновесии по Харди–Вайнбергу по всем локусам во всех вы-



Рис. 1. Локализация мест взятия проб. 1 – р. Виахту, 2 – оз. Валентины, 3 – оз. Благодатное, 4 – руч. Курильский.

борках (уровни значимости превышают 0.05), за исключением локусов *Ssa197* в выборке из оз. Благодатное ( $p = 0.023$ ) и *SnaMSU01* у кеты оз. Валентины ( $p = 0.011$ ); однако на уровне 0.01 отклонения незначимы, тем более они незначимы при введении поправки Бонферрони на множественные выборки.

Различные популяции отличаются друг от друга по генетическому разнообразию. Минимальное внутривидовое разнообразие отмечено у кунджи руч. Курильский как по среднему числу аллелей (поправку на объем выборки не делали из-за практически одинакового числа генотипированных особей), так и по ожидаемой гетерозиготности (табл. 2). Это, вероятно, связано с сильным антропогенным давлением на эту попу-

**Таблица 1.** Характеристика исследованных микросателлитных локусов кунджи

| Локус             | Повторяющаяся последовательность                                              | Температура отжига, °C | Интервал аллельных размеров | Источник информации и “родной” вид* |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| <i>Omy301</i>     | (CA) <sub>n</sub>                                                             | 50                     | 62–80                       | [10], микижа                        |
| <i>Smm3</i>       | (CA) <sub>n</sub> CG(CA) <sub>n</sub>                                         | 51                     | 114–124                     | [11], мальма                        |
| <i>Smm5</i>       | (CA) <sub>n</sub> C(CA) <sub>n</sub>                                          | 52                     | 80–100                      | Там же                              |
| <i>Smm17</i>      | (CA) <sub>n</sub>                                                             | 51                     | 111–131                     | »                                   |
| <i>Smm21</i>      | (TC) <sub>n</sub> TTTC(TC) <sub>n</sub>                                       | 54                     | 113–129                     | »                                   |
| <i>Ssa197</i>     | (GT) <sub>n</sub> C(TG) <sub>n</sub> TC(TG) <sub>n</sub> A(GTGA) <sub>n</sub> | 52                     | 114–126                     | [12], семга                         |
| <i>Ssa20.19</i>   | (AC/TG) <sub>n</sub>                                                          | 51                     | 81–91                       | [13], семга                         |
| <i>One109**</i>   | (TAGA) <sub>n</sub>                                                           | 56                     | 88–156                      | [14], нерка                         |
| <i>Sle6**</i>     | (CA) <sub>n</sub>                                                             | 50                     | 85–99                       | [9], кунджа                         |
| <i>Sle5**</i>     | (GCGT) <sub>n</sub> (GT) <sub>n</sub>                                         | 53                     | 102–148                     | Там же                              |
| <i>Sle4**</i>     | (CA) <sub>n</sub>                                                             | 53                     | 106–140                     | »                                   |
| <i>SnaMSU01**</i> | (GACA) <sub>n</sub>                                                           | 50                     | 76–184                      | [15], речная форель                 |

\* “Родной” — это вид, для которого была разработана данная пара праймеров.

\*\* Локусы с модифицированными праймерами, уменьшающими размер ПЦР-продукта.

ляцию. Действительно, в течение многих десятков лет эта популяция подвержена стрессу, поскольку находится вблизи поселка и интенсивно облавливаются рыбаками-любителями. Кроме того, руч. Курильский впадает в водоток, в который выпускается молодь горбуши и кеты с рыбозавода “Курильский”; ранее популяция кунджи здесь подвергалась прореживанию для снижения потерь заводской рыбы из-за хищничества. Остальные три популяции кунджи гораздо меньше подвержены направленному антропогенному давлению. Таким образом, предложенная

панель микросателлитных локусов способна выявить тренды генетического разнообразия популяций, в том числе связанные с деятельностью человека.

Обследованные популяции кунджи значительно дифференцированы друг от друга. Значения  $\theta$ , рассчитанные для всех выборок, лежат в пределах от 3.1% (локус *Sle4*) до 19.0% для *Smm3* (табл. 2). Усредненное по всем выборкам и локусам значение  $\theta$  равно 8.0% с 95%-ным доверительным будстреп-интервалом [5.8, 10.3]. На бескорневом дереве (рис. 2) видно, что выборки располагаются в соответствии с их географической удаленностью друг от друга. Наиболее сближены выборки в пределах географически небольшого района — из озера Благодатного и ручья Курильского (о. Итуруп): значение  $\theta$  для них равно 1.9%, что статистически значимо с 95%-ным доверительным будстреп-интервалом [0.87, 2.8]. Популяции кунджи из водоемов соседних островов (Итурупа и Кунашира) подразделены сильнее, чем популяции в пределах одного острова, поскольку они более удалены и репродуктивно более изолированы друг от друга: среднее значение  $\theta$  для них равно 4.4%. Еще большие генетические отличия от остальных исследованных популяций характеризует кунджу более удаленной р. Виахту (о. Сахалин), дифференциация которой от кунджи Южных Курил в величинах  $\theta$  достигает 12.0%. В данном случае четко прослеживается модель изоляции расстоянием, выявляемая нашей панелью маркеров: чем сильнее репродуктивная изоляция, тем значительней генетическая дифференциация по нейтральным и слабоселективным маркерам, каковыми в основном и являются микросателлиты.

**Рис. 2.** Бескорневое дерево исследованных популяций кунджи.

Таблица 2. Изменчивость популяций кунджи по микросателлитным локусам

| Локус                     | Параметры            | Выборка   |               |                 |                 | Среднее  | Общее число различных по размеру аллелей | $\theta$ (%), индекс межпопуляционной дифференциации |
|---------------------------|----------------------|-----------|---------------|-----------------|-----------------|----------|------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|                           |                      | р. Виахту | оз. Валентины | оз. Благодатное | руч. Курильский |          |                                          |                                                      |
| <i>Omy301</i>             | <i>A/N</i>           | 3/48      | 7/48          | 7/47            | 6/48            | 5.5/47.8 | 7                                        | 10.3                                                 |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.446     | 0.692         | 0.817           | 0.771           | 0.682    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | –0.169    | –0.207        | 0.063           | 0.055           | –0.045   |                                          |                                                      |
| <i>Smm3</i>               | <i>A/N</i>           | 3/48      | 3/48          | 3/48            | 1/48            | 2.5/48   | 4                                        | 19.0                                                 |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.495     | 0.272         | 0.138           | 0.0             | 0.226    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | –0.009    | –0.150        | 0.247           | –               | –0.012   |                                          |                                                      |
| <i>Smm5</i>               | <i>A/N</i>           | 3/47      | 4/48          | 4/48            | 3/48            | 3.5/47.8 | 6                                        | 3.7                                                  |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.430     | 0.245         | 0.451           | 0.334           | 0.365    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | –0.139    | –0.020        | 0.077           | 0.191           | 0.023    |                                          |                                                      |
| <i>Smm17</i>              | <i>A/N</i>           | 6/48      | 6/48          | 5/48            | 5/48            | 5.5/48   | 6                                        | 4.9                                                  |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.477     | 0.629         | 0.656           | 0.521           | 0.571    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | 0.039     | –0.026        | 0.015           | –0.040          | –0.004   |                                          |                                                      |
| <i>Smm21</i>              | <i>A/N</i>           | 2/48      | 1/48          | 1/48            | 1/48            | 1.3/48   | 2                                        | 11.5                                                 |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.221     | 0.0           | 0.0             | 0.0             | 0.055    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | 0.058     | –             | –               | –               | 0.058    |                                          |                                                      |
| <i>Ssa197</i>             | <i>A/N</i>           | 3/48      | 2/48          | 2/48            | 2/48            | 2.3/48   | 3                                        | 6.1                                                  |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.395     | 0.468         | 0.505           | 0.500           | 0.467    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | 0.103     | –0.024        | 0.343*          | 0.126           | 0.142    |                                          |                                                      |
| <i>Ssa20.19</i>           | <i>A/N</i>           | 1/48      | 2/48          | 1/48            | 1/48            | 1.3/48   | 2                                        | 3.2                                                  |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.0       | 0.081         | 0.0             | 0.0             | 0.020    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | –         | –0.033        | –               | –               | –0.033   |                                          |                                                      |
| <i>One109</i>             | <i>A/N</i>           | 7/42      | 7/48          | 7/48            | 5/42            | 6.5/45   | 11                                       | 7.0                                                  |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.758     | 0.521         | 0.745           | 0.633           | 0.664    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | 0.058     | 0.041         | –0.091          | –0.016          | –0.005   |                                          |                                                      |
| <i>Sle6</i>               | <i>A/N</i>           | 2/48      | 2/48          | 4/48            | 3/48            | 2.8/48   | 4                                        | 11.1                                                 |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.205     | 0.504         | 0.534           | 0.486           | 0.433    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | 0.086     | 0.009         | 0.261           | –0.158          | 0.049    |                                          |                                                      |
| <i>Sle5</i>               | <i>A/N</i>           | 5/48      | 7/47          | 8/48            | 6/48            | 6.5/47.8 | 13                                       | 13.1                                                 |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.746     | 0.711         | 0.664           | 0.447           | 0.642    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | 0.136     | –0.079        | 0.059           | 0.069           | 0.045    |                                          |                                                      |
| <i>Sle4</i>               | <i>A/N</i>           | 19/48     | 16/48         | 13/48           | 11/48           | 14.8/48  | 31                                       | 3.1                                                  |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.825     | 0.855         | 0.738           | 0.724           | 0.786    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | 0.040     | 0.001         | –0.044          | –0.007          | –0.001   |                                          |                                                      |
| <i>SnaMSU01</i>           | <i>A/N</i>           | 16/48     | 21/48         | 18/48           | 13/48           | 17/48    | 29                                       | 7.0                                                  |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.781     | 0.915         | 0.864           | 0.895           | 0.864    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | 0.013     | 0.185*        | 0.133           | –0.001          | 0.096    |                                          |                                                      |
| Среднее значение на локус | <i>A/N</i>           | 5.8/47.4  | 6.4/47.9      | 6.1/47.9        | 4.8/47.5        | 5.8/47.7 | 9.8                                      | 8.0                                                  |
|                           | <i>H<sub>E</sub></i> | 0.482     | 0.491         | 0.509           | 0.443           | 0.481    |                                          |                                                      |
|                           | <i>f</i>             | 0.024     | –0.010        | 0.085           | 0.016           | 0.030    |                                          |                                                      |

Примечание. *A/N* – число различных по размеру аллелей в выборке/число генотипированных образцов; *H<sub>E</sub>* – ожидаемая гетерозиготность; *f* – внутрипопуляционный коэффициент инбридинга.

\* Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга на уровне значимости меньше 0.05.

Таким образом, настоящее исследование продемонстрировало значительную генетическую подразделенность популяций кунджи Сахалинской области, а также явилось свидетельством того, что предложенный набор микросателлитных маркеров может с успехом использоваться для широких популяционно-генетических и экологических исследований этого вида.

Авторы признательны участникам экспедиции Сахалинрыбвода в 2010 г. за собранный материал (образцы плавников) по кундже р. Виахту.

Исследование было отчасти поддержано грантами Программ Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и “Живая природа: Динамика и сохранение генофондов” и программы ОБН РАН “Биологические ресурсы России”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Есин Е.В., Сорокин Ю.В. Жилая кунджа *Salvelinus leucomaenis* из термального ручья, впадающего в Семлячский лиман (Кроноцкий заповедник, Камчатка) // Вопр. ихтиологии. 2012. Т. 52. № 2. С. 207–214.
2. Савваитова К.А., Кузицин К.В., Пичугин М.Ю. и др. Систематика и биология кунджи *Salvelinus leucomaenis* // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47. № 1. С. 58–71.
3. Yoshiyasu K., Humoto Y. Starch-gel electrophoresis of hemoglobin of freshwater salmonid fishes in southwest Japan – I. Genus *Salvelinus* (char) // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1972. V. 38. P. 779–788.
4. Nakajima M., Fujio Y. Genetic differentiation among local populations of Japanese char *Salvelinus leucomaenis* // Fish. Sci. 1995. V. 61. P. 11–15.
5. Yamamoto S., Morita K., Kitano S. et al. Phylogeography of white-spotted char (*Salvelinus leucomaenis*) inferred from mitochondrial DNA sequences // Zool. Sci. 2004. V. 21. P. 229–240.
6. Scribner K.T., Crane P.A., Spearman W.J., Seeb L.W. DNA and allozyme markers provide concordant estimates of population differentiation: analyses of US and Canadian populations of Yukon River fall-run chum salmon (*Oncorhynchus keta*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1998. V. 55. P. 1748–1758.
7. Small M.P., Frye A.E., Von Bargen J.F., Young S.F. Genetic structure of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) populations in the lower Columbia River: Are chum salmon in Cascade tributaries remnant populations? // Conserv. Genet. 2006. V. 7. P. 65–78.
8. Животовский Л.А., Афанасьев К.И., Рубцова Г.А. и др. О создании базы ДНК-данных для решения проблем воспроизводства, идентификации и сертификации популяций тихоокеанских лососей на примере кеты о. Итуруп // Вопр. рыболовства. 2008. Т. 9. № 1(33). С. 96–109.
9. Yamaguchi K., Nakajima M., Taniguchi N. Development of microsatellite markers in the Japanese char *Salvelinus leucomaenis* and its application to closely related species // Fish Genetics and Breeding Sci. 2008. V. 38. P. 123–130.
10. Estoup A., Presa P., Krieg F. et al. (CT)n and (GT)n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout) // Heredity. 1993. V. 71. P. 488–496.
11. Crane P.A., Lewis C.J., Kretschmer E.J. et al. Characterization and inheritance of seven microsatellite loci from Dolly Varden, *Salvelinus malma*, and cross-species amplification in Arctic char, *S. alpinus* // Conserv. Genetics. 2004. V. 5. P. 737–741.
12. O'Reilly P., Hamilton L.C., McConnell N., Wright J.M. Rapid detection of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1996. V. 53. P. 2292–2298.
13. Sanchez J.A., Clabby C., Ramos D. et al. Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L. (Atlantic salmon) // Heredity. 1996. V. 77. P. 423–432.
14. Olsen J.B., Wilson S.L., Kretschmer E.J. et al. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon // Mol. Ecol. 2000. V. 9. № 12. P. 2185–2187.
15. Rollins M.F., Vu N.V., Spies I.B., Kalinowski S.T. Twelve microsatellite loci for lake trout (*Salvelinus namaycush*) // Mol. Ecol. Resources. 2009. V. 9. P. 871–873.

## Microsatellite Variation in White-Spotted Char *Salvelinus leucomaenis* from Sakhalin Oblast

K. I. Afanas'ev, G. A. Rubtsova, E. G. Shaikhaev, and L. A. Zhivotovskii

Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

e-mail: levazh@gmail.com

A panel of 12 polymorphic microsatellite markers was developed for the population genetic studies of white-spotted char *Salvelinus leucomaenis*. The four population samples examined consisted of 48 individuals each, and were collected in different geographical regions, including Sakhalin Island, Kunashir Island, and Iturup Island (two samples). The total number of different-sized alleles at different loci varied in the range of 2–31. In the population of white-spotted char subjected to strong anthropogenic pressure allelic diversity and expected heterozygosity indices were found to be lower than in wild populations of this species. The considerable genetic subdivision of different insular populations of white-spotted char observed was consistent with isolation by the distance model.