

*Изучение популяционной структуры
сахалинского тайменя в целях выработки мер
сохранения его генофонда*

ОТЧЁТ

по Дополнительному Соглашению №1 к
Договору на проведение НИР №221110-1
от 28 октября 2011г.

02 декабря 2011г.

ТЕМА

«Изучение популяционной структуры сахалинского тайменя в целях выработки мер сохранения его генофонда»

Цель всей работы:

Основной целью работы по Договору является определение степени генетической дифференциации популяций сахалинского тайменя по ДНК-маркерам для оценки их репродуктивной изоляции друг от друга и выработке мер сохранения их генофонда.

Этапы работы

Этап 1 (01 ноября 2011г. – 20 ноября 2011г.): Анализ биологических образцов из популяций сахалинского тайменя, собранных в ходе экспедиционных работ 2011г. Анализ данных, полученных в результате исследований 2009-2011гг.

Исполнители (сотрудники и аспиранты Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН):

Животовский Лев Анатольевич (научный руководитель работ) – зав. лабораторией генетической идентификации, доктор биол. наук, профессор;

Юрченко Андрей Александрович – аспирант ИОГЕН РАН;

Шитова Марина Владимировна – канд. биол. наук, научный сотрудник.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ РАБОТЫ

1. Собран популяционный материал по 10-ти выборкам сахалинского тайменя из рек Набиль, Даги, Вал, Тымь, Лангери, Агнево, Виахту, р. Поронай (р. Ельная, р. Онорка, основного русла р. Поронай) и оз. Айнское в ходе экспедиций 2009-2011гг.; ещё 4 выборки (из оз. Айнское и р. Агнево) представляла собой чешуйный материал, собранный в 1990-е годы.
2. Предложена сводная панель 21 полиморфных микросателлитных маркеров ДНК для исследования популяционной структуры сахалинского тайменя.
3. Успешно опробовано выделение ДНК и анализ микросателлитных маркеров из чешуи, что позволяет использовать старые чешуйные книжки и исследовать давние выборки тайменя.
4. Выделены три генетических кластера выборок, представляющих собой географически подразделенные популяционные группировки тайменя о. Сахалин: западного Сахалина, северо-восточного Сахалина, системы р. Поронай. В тоже время в пределах каждой группировки популяции также отличаются друг от друга, хотя и меньше, чем от популяций других группировок.
5. Популяция р. Лангери отделяется от указанных кластеров сахалинского тайменя. Однако, ввиду отсутствия выборок из соседних с Лангери водоемов нельзя однозначно утверждать наличие генетического кластера тайменя из водоемов восточного Сахалина, тем более что таймень р. Лангери генетически промежуточен между популяционными группировками северо-восточного Сахалина и реки Поронай.

6. В качестве минимальной стратегии поддержания и охраны сахалинского тайменя в северной части острова Сахалин рекомендуем выбрать наименее затронутые популяции сахалинского тайменя в каждой из выделенных территориальных группировок вида:
1. по группировке северо-восточного Сахалина: р. Даги;
 2. по группировке западного Сахалина: р. Агнево;
 3. р. Лангери;
 4. весь бассейн р. Поронай.
7. В качестве максимальной стратегии следует охранять все исследованные популяции сахалинского тайменя, поскольку каждая из них отличается от всех других – даже в пределах одной территориальной группировки.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ

Сахалинский таймень, *Parahucho perryi* (Brevoort) - это узкорареальный, эндемичный вид Дальнего Востока, занесенный в красную книгу России (присвоена категория – 2, сокращающиеся в численности популяции эндемичного для Дальнего Востока вида) (Красная книга..., 2001), занесен в красный список МСОП (от фр. *Union internationale pour la conservation de la nature*, IUCN) (*IUCN Red List of Threatened Animals*) – как вид находящийся в критической опасности, сокращающейся в численности (*Critically Endangered*). Промышленное и любительское рыболовство, браконьерский вылов, деградация мест обитания и активное хозяйственное освоение существующих сейчас ограниченных территорий обитания сахалинского тайменя (вырубки леса в Приморье и Хабаровском крае, нефтегазовые проекты на острове Сахалин) приводят к снижению численности и фрагментации ареала обитания сахалинского тайменя, что ведет к репродуктивной изоляции особей этого вида (Золотухин и др., 2000). В свою очередь, репродуктивная изоляция у вида с низкой численностью может быть основной причиной генетической дифференциации популяций, что можно выявить, изучая полиморфизм ДНК-маркеров. С помощью этих маркеров можно оценить степень генетической дифференциации вида, уровень инбридинга, миграций и другие популяционно-статистические данные, которые важны для разработки мер по охране и мониторингу редких видов (Bos & Sites 2001; Balakrishnan et al. 2003; Alpers et al. 2004; Henry et al. 2009).

В популяционных исследованиях для целей охраны и мониторинга редких видов требуется использование большого количества ДНК-маркеров, так как в условиях низкой численности вида очень трудно, а подчас и

невозможно, добыть необходимое количество образцов для исследования. Численность особей в некоторых изолированных популяциях может не превышать нескольких десятков особей (Золотухин и др. 2000). Таким образом, единственный способ, с помощью которого можно уменьшить статистические ошибки исследования, это использование большого количества ДНК-маркеров. Ранее европейскими и японскими исследователями было предложено два набора микросателлитных локусов для изучения сахалинского тайменя. Один из них включал восемь умеренно полиморфных локусов с динуклеотидными повторами (Hatakejama et al. 2005), другой – шесть локусов с ди- и тетрануклеотидными повторами (Korun et al. 2009). Однако эти два набора не были проанализированы вместе на одних и тех же выборка для оценки совместимости их в популяционном исследовании.

В данной работе большое внимание было уделено совмещению указанных двух наборов микросателлитных маркеров, а также разработка дополнительных маркеров. В результате, к ранее предложенным панелям локусов мы добавили еще шесть дополнительных микросателлитных локусов обнаруженных у сахалинского тайменя путем межвидовой амплификации (cross-species amplification) и модификации праймеров для некоторых локусов. В итоге мы предлагаем набор из 21 микросателлитного локуса, использование которого позволило выявить популяционно-генетическую структуру сахалинского тайменя по имеющимся выборкам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка панели ДНК-маркеров

Генотипирование особей на уровне отдельных фрагментов ДНК стал

инструментом популяционных исследований с середины 1990-х. Основное преимущество ДНК-маркеров перед другими типами маркеров заключается в их высоком полиморфизме и возможности экстрагировать ДНК из любой ткани организма – например, достаточно небольшого кусочка плавника, взятие которого не наносит ущерба жизнеспособности рыбы, что важно при изучении редких видов.

Биологические образцы были взяты прижизненно от взрослых особей тайменя и хранятся в лаборатории генетической идентификации Института общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН. Во время сбора они были зафиксированы в 96%-м этаноле. Из них выделена ДНК, которую затем использовали для генотипирования по ДНК-маркерам. Некоторые выборки были предоставлены нам в виде чешуйного материала, из которого удалось успешно экстрагировать ДНК.

Микросателлитные маркеры. Основными ДНК-маркерами в нашем исследовании являются микросателлиты. Ранее европейскими и японскими исследователями было предложено два набора микросателлитных локусов для изучения сахалинского тайменя. Один из них включал восемь умеренно полиморфных локусов с динуклеотидными повторами (Hatakejama et al. 2005), другой – шесть локусов с ди- и тетрануклеотидными повторами (Korun et al. 2009). Однако эти два набора не были проанализированы вместе на одних и тех же выборка для оценки совместимости их в одном популяционном исследовании.

В нашей работе, к ранее предложенным панелям локусов, мы добавили еще шесть дополнительных микросателлитных локусов, обнаруженных у сахалинского тайменя путем межвидовой амплификации (cross-species amplification) и модификации праймеров для некоторых локусов. В итоге мы разработали **панель из 21 микросателлитного локуса**, использование

которого позволяет исследовать популяционно-генетическую структуру сахалинского тайменя (см. Приложения 1 и 2). Общий список маркеров: *Pper1*, *Pper2*, *Pper5*, *Hper25*, *Pper8*, *Smm5*, *Smm17*, *Omy301*, *Pper11*, *Hper15*, *Hper4*, *Hper16*, *Bletri3*, *Bletet5*, *Hper5*, *Pper6*, *Pper7*, *Pper3*, *Hper6*, *Hper8*, *HPer25*.

Митохондриальная ДНК. Для исследования популяционной структуры сахалинского тайменя удобны следующие три потенциально полиморфных фрагмента митохондриальной ДНК (мтДНК): контрольный регион (*D-loop*), субъединица I гена цитохром-с-оксидазы (COX1), субъединица 1 гена NADH-дегидрогеназы (ND1). Как показала работа Олейник и Скурихина (2008), популяции тайменя оказываются в значительной степени мономорфными по мтДНК, причём каждая из этих популяций имеет свой уникальный гаплотип. Это говорит о малой эффективной численности популяций сахалинского тайменя и их репродуктивной изоляции. Однако этот вывод сделан на небольшой выборке. Мы находимся в процессе анализа мтДНК по всему спектру полученных нами выборок сахалинского тайменя.

ДНК-анализ. Для ПЦР-амплификации использовали наборы Gene Park PCR Core (ООО «ИзоГен», Россия), к которым добавляли 5 мкл смеси праймеров (конечная концентрация каждого - 0,5 мкМ) и 5 мкл исследуемой ДНК. Амплификацию микросателлитных локусов проводили в термоциклере «Applied Biosystems 9800 Fast» и «Applied Biosystems Veriti 96 Well Fast» при следующем режиме: реакцию начинали процессом денатурации в течение 2 мин. при 94⁰ С, затем проводили 30 циклов, включающих 30 секунд денатурации ДНК-матрицы при температуре 94⁰С, 30 секунд отжига праймеров при 50-51⁰С и синтез новых цепей в течение 30 секунд при 72⁰С; далее следовала элонгация 2 мин. при 72⁰С и охлаждение до 4⁰С. При апробации всех локусов использовалась температура отжига для каждой

пары праймеров 50-51 °С, в зависимости от полученных результатов для некоторых пар праймеров температура повышалась до 54-56 °С.

Аликвоты амплифицированных продуктов микросателлитных локусов разделяли в вертикальном блоке (длина 21 см) 6% неденатурирующего полиакриламидного геля в 0,5x TBE буфере рН 8,0 (Маниатис и др., 1992) при 300В в течение 2-4 часов.

Полученные электрофореграммы визуализировали путем окрашивания бромистым этидием (5 мкг/мл, 10-15 мин) и фотографировали в УФ-свете.

В качестве маркеров длины фрагментов использовали ДНК плазмиды *pBr322* (НПО «СибЭнзим», Россия), обработанную рестриктазами - либо *HaeIII*, либо *HpaII*, либо *BstFI* (НПО «СибЭнзим», Россия). Размеры фрагментов по каждому локусу определяли с использованием программы «Molecular Imaging Software, Version 4.0» фирмы Kodak.

Выборки

В ходе работы были исследованы выборки, собранные нами во время экспедиций в 2009-2011гг. Для сравнения и для надёжности выводов мы исследовали также биологические образцы, переданные нам коллегами из других учреждений, в т.ч. чешуйный материал из старых чешуйных книжек (рис.1). Суммарный объем выборок – 233 особи. Выборка 2009г. из р. Агнево включает всего трёх особей и исключена из популяционного анализа; вместо неё использована выборка на основе чешуйного материала.

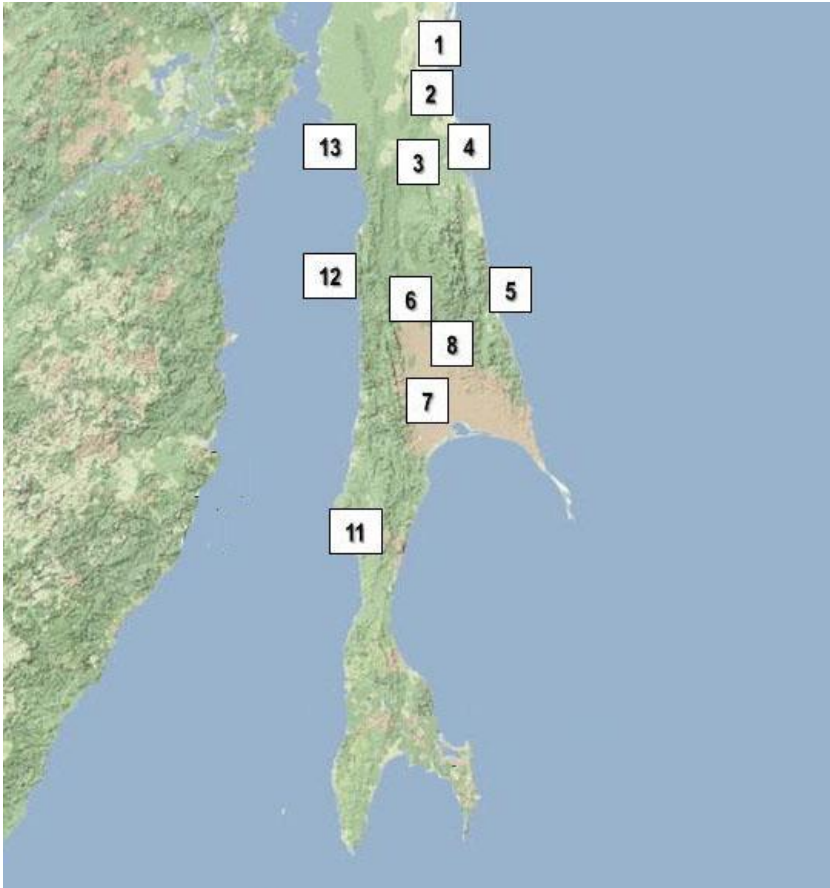


Рис. 1. Водоёмы, в которых были взяты выборки сахалинского тайменя.

1-Вал, 2-Даги, 3-Тымь, 4-Набиль, 5-Лангери, 6-Онорка, 7-Ельная, 8-Поронай (русло), 11-Айнское, 12-Агнево, 13-Виэхту.

Примечание. Выборка из Виэхту была взята в ходе исследований, проводимых Сахрыбводом.

Дополнительные выборки из рек Набиль и Агнево и оз. Айнское были предоставлены нам проф. Сафроновым С.Н. в виде образцов чешуи (на рис.2 обозначены индексом S).

Генетическое сходство между популяциями тайменя

Для исследования генетической уникальности популяций и оценки близости их друг к другу были вычислены коэффициенты генетического сходства между всеми возможными парами выборок по формуле Животовского (1979): $r = \frac{1}{LA} \sum_{la} \sqrt{p_{ila} p_{jla}}$, где L и A означают число локусов и число аллелей в локусе, p – это частота соответствующего аллеля в сравниваемых выборках i и j ; использование этого показателя сходства предпочтительно ввиду лучшего учёта нечастых аллелей).

По полученной матрице попарного сходства вычисляли главные компоненты с использованием программы SPSS. Рис. 2 демонстрирует расположение выборок тайменя в пространстве первых трёх компонент.

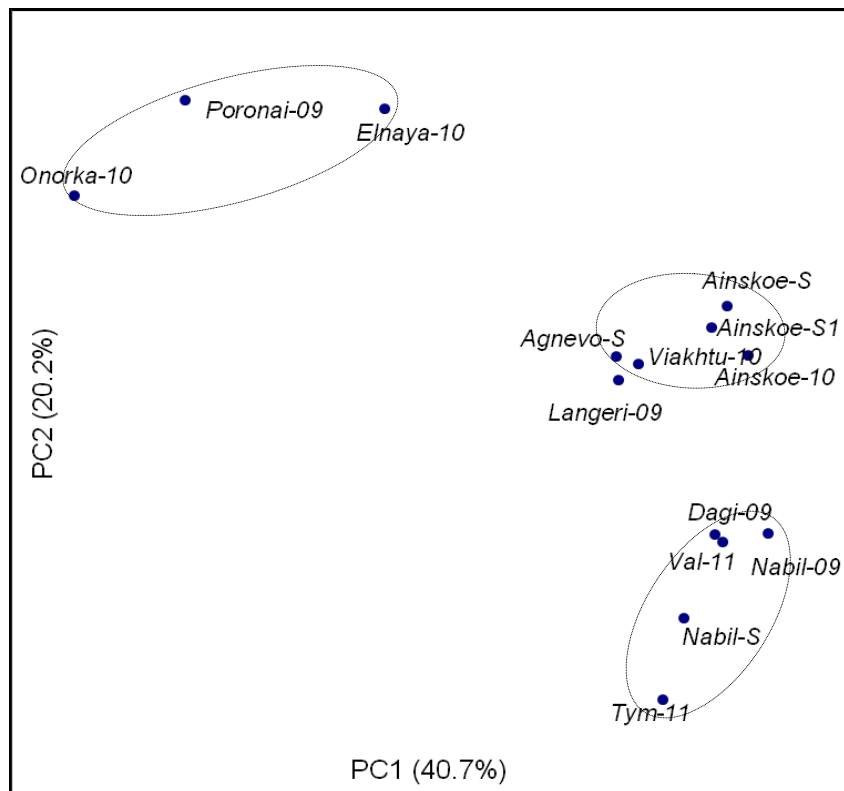


Рис. 2а

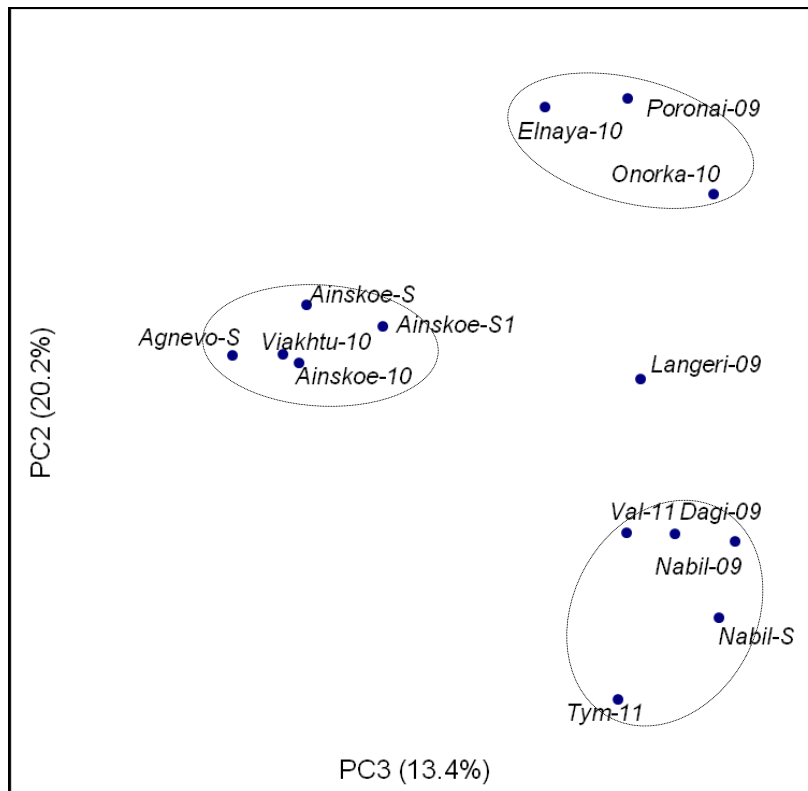


Рис. 2б

Рис. 2. Расположение исследованных выборок сахалинского тайменя в пространстве главных компонент по ДНК-маркерам.

Однозначно выделяются три генетических кластера выборки, представляющих собой географически подразделенные популяционные группировки тайменя о. Сахалин. Это группировка тайменя водоемов западного Сахалина: оз. Айнское и реки Агнево и Виахту. Вторая группировка - водоемы северо-восточного Сахалина: Вал, Даги, Набиль, Тымь. Третья – выборки из бассейна р. Поронай: притоки Онорка и Ельная и главное русло р. Поронай.

Река Лангери отстоит от этих группировок и можно предположить, что таймень из соседних рек западного Сахалина (севернее мыса Терпения) образует вместе с тайменем р. Лангери подобную популяционную группировку. Поэтому требуется дальнейшие исследования тайменя в Смирныховском и соседних районах Сахалина.

В пределах каждой группировки популяции сахалинского тайменя также отличаются друг от друга, хотя и меньше, чем от популяций других группировок. Тем не менее показатель F_{ST} для них достаточно велик: 9.4% для западного Сахалина (без учета дифференциации между повторными выборками из оз. Айнское), 8.6% между популяциями северо-восточного Сахалина, 11.7% в пределах речной системы р. Поронай. Это очень большие величины дифференциации.

Популяция р. Лангери отделяется от указанных кластеров сахалинского тайменя. Однако, ввиду отсутствия выборки из соседних с Лангери водоемов нельзя однозначно утверждать наличие генетического кластера тайменя из водоемов восточного Сахалина, тем более что таймень р. Лангери генетически является промежуточным между популяционными группировками северо-восточного Сахалина и реки Поронай.

Внутрипопуляционное генетическое разнообразие

Генетическое (аллельное) разнообразие не очень сильно отличается в исследованных популяциях сахалинского тайменя, за исключением популяции р. Онорка бассейна реки Поронай и р. Тымь (табл. 2).

Таблица 2. Аллельное разнообразие в исследованных выборках сахалинского тайменя.

Выборки	Среднее число обнаруженных аллелей	Разнообразие (ожидаемая гетерозиготность)
оз. Айнское	5.9	0.56
р. Виахту	5.0	0.49
р. Агнево*	4.3	0.56
р. Поронай (р. Ельная)	3.9	0.49
р. Поронай (р. Онорка)	2.8	0.39
р. Поронай (осн. русло)	3.7	0.50
р. Даги	4.6	0.46
р. Вал	4,1	0.49
р. Набиль	4.5	0.53
р. Тымь	3.3	0.47
р. Лангери	3.8	0.55

Примечание: В таблице указаны данные по выборкам 2009-2011г, за исключением выборки из р. Агнево (чешуйный материал).

Природоохранная стратегия для сахалинского тайменя северной части о. Сахалин

Генетические данные указывают на то, что указанные популяционные

группировки сахалинского тайменя должны быть первоочередным объектом природоохранных мероприятий. Если невозможно организовать охрану всех популяций каждой из этих группировок, то в любом случае следует сконцентрировать усилия по охране хотя бы одной популяции в каждой из этих популяционных группировок. Поскольку генетическое разнообразие в каждой из отдельных популяций сопоставимо друг с другом, то поэтому в качестве минимальной стратегии поддержания и охраны сахалинского тайменя в северной части острова Сахалин рекомендуем выбрать наименее затронутые популяции сахалинского тайменя в каждой из выделенных популяционных группировок вида. А именно:

р. Агнево (популяционная группировка западного Сахалина);

р. Даги (популяционная группировка северо-восточного Сахалина);

р. Лангери.

Более широкая природоохранная стратегия

Прежде чем перейти к обсуждению популяционной группировки сахалинского тайменя р. Поронай, укажем на необходимость более широкой природоохранной стратегии для выделенных популяционных группировок.

В случае если возможна более широкая охрана тайменя (шире, чем предложенная минимальная стратегия), то в пределах западного Сахалина большое внимание должно быть уделено охране сахалинского тайменя озера Айнское. Из исследованных популяций сахалинского тайменя наибольшее генетическое разнообразие обнаружено в оз. Айнское (табл. 2). В то же время в экологическом плане эта популяция находится на критическом уровне возрастной структуры: согласно наблюдениям, её численность уменьшилась за последние годы и почти отсутствуют старшие возрастные группы, что говорит о том, что идёт интенсивный вылов производителей тайменя и воспроизводство этой популяции находится под угрозой.

Высокое генетическое разнообразие в данном случае говорит о том, что ещё сравнительно недавно популяция сахалинского тайменя оз. Айнское достигала высокой численности (бóльшей, чем другие исследованные популяции этого вида), что за много предыдущих поколений привело к накоплению значительного генетического разнообразия, которое всё ещё хранится в генофонде молодой части популяции. На-сегодня популяция сахалинского тайменя оз. Айнское находится в генетически хорошем состоянии. Однако её экологическое состояние ухудшается: её численность и репродуктивный потенциал падают. Если это падение не остановить, то со временем оно приведёт к генетической деградации, за которым последует исчезновение стада.

Так что уже сейчас, пока популяция сахалинского тайменя оз. Айнское ещё в генетически хорошем состоянии, следует принять предупредительные меры к охране бассейна и мест нереста, в первую очередь направленные на сохранение крупных производителей старших возрастных групп этой популяции. Не исключено, что большое число тайменей могут вылавливаться в устье протоки ставными неводами, так что охрана популяции сахалинского тайменя оз. Айнское должна охватывать также устьевую и предустьевую участки водоема.

В группировке тайменя северо-восточного Сахалина популяции рек Даги, Вал и Набиль относительно близки друг к другу – их генетическая дифференциация – всего 3.9%, хотя это является статистически значимой величиной с доверительным интервалом (2.2%, 5.7%). Поэтому любую из них можно было бы выделить в качестве базовой природоохранной единицы, но мы выбрали популяцию р. Даги как многочисленную и в то же время с уже проводимыми мероприятиями по сохранению сахалинского тайменя. Что касается популяции р. Тымь, то она имеет минимальное генетическое

разнообразии среди всех исследованных популяций (за исключением р. Онорка) и значительно удалена от популяций тайменя рек Даги, Вал и Набиль, что скорее всего вызвано процессами генетического дрейфа, вызванного её возможно низкой численностью ввиду сильного антропогенного давления в бассейне реки Тымь. Сахалинский таймень реки Тымь требует мероприятий по восстановлению своей численности, что может быть сделано только на основе собственной популяции, и только при невозможности её поддержания из-за низкой численности возможна интродукция, но не далее как из указанных популяций северо-восточной группировки сахалинского тайменя.

Таймень западного Сахалина (севернее мыса Терпения) наименее изучен из выделенных популяционных группировок и мы предварительно выделяем р. Лангери как основу для поддержания этой популяционной группировки сахалинского тайменя.

Что касается тайменя реки Поронай, то сейчас невозможно выделить какой-то из его субпопуляционных компонентов в качестве самостоятельной природоохранной единицы: все три имеющиеся выборки оттуда имеют свой генетический профиль. Но если выборка из р. Ельная и основного русла Проня относительно близки к показателям разнообразия других популяций, то в популяции тайменя р. Онорка она минимальна. Табл. 2 показывает, что в популяции р. Онорка число аллелей гораздо меньше, чем в популяции р. Ельная (даже после поправки на разные объемы выборок). Также меньше индекс разнообразия и доля редких аллелей. Это свидетельствует об обеднении генофонда популяции сахалинского тайменя р. Онорка, вероятно вследствие сильного падения её численности. Скорее всего, это вызвано антропогенным давлением, так как вблизи находится поселок.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что популяции сахалинского тайменя в р. Поронай репродуктивно значительно изолированы друг от друга (в противном случае, при наличии генного обмена, аллельное разнообразие популяции Онокки пополнилось бы за счёт популяции р. Ельная и других популяций). Такое генетическое отличие популяции сахалинского тайменя р. Онокка, скорее всего, вызвано генетическими процессами, приведшими к смещению частот аллелей в этой популяции вследствие дрейфа генов, значительного по интенсивности из-за её низкой репродуктивной численности; в частности это привело к обеднению её генофонда. Однако нельзя исключить и определенную уникальность популяции р. Онокка: несмотря на её малый размер, в ней встречаются аллели, отсутствующие в более «благополучной» популяции р. Ельная и в других популяциях сахалинского тайменя. Не исключено, что таймень р. Поронай является сложным популяционным образованием и требует более подробного изучения, а не однократных случайных выборок. В любом случае, невозможно выделить какую-то одну единицу охраны в пределах р. Поронай и мы считаем, что вся популяционная группировка тайменя реки Поронай должна быть единицей природоохранных мероприятий.

Таким образом, в качестве минимальной стратегии поддержания и охраны сахалинского тайменя в северной части острова Сахалин следует выбрать следующие популяции:

1. по группировке северо-восточного Сахалина: р. Даги;
2. по группировке западного Сахалина: р. Агнево;
3. р. Лангери;
4. весь бассейн р. Поронай.

В качестве максимальной стратегии следует охранять все исследованные популяции сахалинского тайменя, поскольку каждая из них отличается от

всех других – даже в пределах одной территориальной группировки.

Публикации

Статья Шитовой МВ, Юрченко АА, Шайхаева ЕГ и Животовского ЛА. «Панель микросателлитных локусов для популяционных исследований сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort)» представлена для публикации в российский журнал.

Готовится статья по генетической дифференциации и популяционной структуре сахалинского тайменя в зарубежный журнал.

Научный руководитель работ

Зав. лабораторией

генетической идентификации ИОГЕН РАН
доктор биол. наук, профессор



Л.А. Животовский

02 декабря 2011г.

Список литературы

- Животовский Л.А. 1979. Показатель сходства популяций по полиморфным признакам // Журн. общей биологии. Т. XL. № 4. С. 587–602.
- Золотухин СФ, Семенченко АЮ, Беляев ВА (2000) Таймени и ленки Дальнего Востока России. Приамурское географическое общество. Хабаровск.
- Шитова МВ, Юрченко АА, Шайхаев ЕГ, и Животовский ЛА. Панель микросателлитных локусов для популяционных исследований сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort) – представлено в ж. «Молекулярная биология».
- Олейник А.Г., Л.А. Скурихина. 2008. Филогенетические связи сахалинского тайменя *Parahucho perryi* по данным PCR-RFLP-анализа митохондриальной ДНК. Генетика 44, с 885-895.
- Alpers DL, Van Vuuren BJ, Arctander P, Robinson TJ (2004) Population genetics of the roan antelope (*Hippotragus equines*) with suggestion for conservation. *Molecular Ecology* **13**:1771-1784
- Balakrishnan CN, Monfort SL, Gaur A, Singh L, Sorenson MD (2003) Phylogeography and conservation genetics of Eld's deer (*Cervus eldi*). *Molecular Ecology* **12**:1-10
- Bos DH, Sites Jr JW (2001) Phylogeography and conservation genetics of the Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*; Amphibia, Ranidae). *Molecular Ecology* **10**:1499-1513
- Buchholz WG, Miller SJ, Spearman WJ (2001) Isolation and characterization of chum salmon microsatellite loci and use across species. *Animal Genetics* **2**:162-165
- Crane PA, Lewis CJ, Kretschmer EJ, Miller SJ, Spearman WJ, DeCicco AL, Lisac MJ, Wenburg JK (2004) Characterization and inheritance of seven microsatellite loci from Dolly Varden, *Salvelinus malma*, and cross-species

- amplification in Arctic char, *S. alpinus*. Conservation Genetics **5**:737-741
- Froufe EK, Sefc M, Alexandrino P, Weiss S (2004) Isolation and characterization of *Brachymystax lenok* microsatellite loci and cross-species amplification in *Hucho* spp. and *Parahucho perryi*. Molecular Ecology Notes **4**:150-152
- Hatakeyama M, Watanabe T, Ikeda M, Nakajima M, Kawamura H, Taniguchi N (2005) Isolation and characterization of microsatellite DNA loci for endangered fish, Japanese huchen (*Hucho perryi*). Molecular Ecology Notes **5**:893-895
- Henry P, Miquelle D, Sugimoto T, McCullough DR, Caccone A, Russello MA (2009) *In situ* population structure and *ex situ* representation of the endangered Amur tiger. Molecular Ecology **18**:3173-3184
- Jackson TR, Ferguson MM, Danzmann RG, Fishback AG, Ihssen PE, O'Connell M, Crease TJ (1998) Identification of two QTL-influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. Heredity **80**:143–151
- Kopun Th, Winkler KA, Weiss S (2009) Eight new polymorphic microsatellite DNA markers for Sakhalin taimen *Parahucho perryi*. Conservation Genetics **10**:1089-1091
- Nelson RJ, Beacham TD (1999). Isolation and cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon. Animal Genetics **30**:228-229
- Olsen JB, Seeb JE (1998) Genetic interpretation of broad-scale microsatellite polymorphism in odd-year pink salmon. Transactions of the American Fisheries Society **127**:535-550
- Olsen JB, Wilson SL, Kretschmer EJ, Jones KC, Seeb JE (2000) Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon. Molecular Ecology. **9**:2185-2187
- Rexroad III CE, Coleman RL, Gustafson AL, Hershberger WK, Killefer J (2002)

- Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries. *Marine Biotechnology* **3**:12-16
- Sanchez JA, Clabby C, Ramos D, Blanco G, Flavin F, Vazquez E, Powell R (1996) Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L. (Atlantic salmon). *Heredity* **77**:423-432
- Small MP, Beacham TD, Withler RE, Nelson RJ (1998) Discriminating coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations within Fraser River, British Columbia, using microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* **7**:141-155
- Smith CT, Koop BF, Nelson RJ (1998) Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids. *Molecular Ecology* **7**:1614-1616
- Slettan A, Olsaker I, Lie O (1997) Segregation studies and linkage analysis of Atlantic salmon microsatellites using haploid genetics. *Heredity* **78**:620-627
- Williamson KS, Cordes JF, May B (2002). Characterization of microsatellite loci in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and cross-species amplification in other salmonids. *Molecular Ecology Notes* **2**:17-19

Приложение 1. Обработка методики анализа микросателлитных маркеров

Мы протестировали 36 микросателлитных локусов, ряд из которых описаны для других видов азиатских лососевых рыб (*Salmoninae*) и на таймене опробованных впервые.

Из локусов, впервые опробованных на таймене, два локуса не дали продукта амплификации, а 19 успешно амплифицировались (для некоторых конструировали новые праймеры) из них 13 оказались мономорфными, а шесть локусов полиморфными и использовались в дальнейшем популяционно-генетическом исследовании. В дополнение нами были разработаны новые праймеры для 12-ти локусов сахалинского тайменя, описанных ранее другими исследователями (Natakejama et al. 2005, Korun et al. 2009), с целью модификации размеров аллелей и оптимизации метода исследования (табл. 1.).

Для проведения ПЦР использовали набор Gen Pack PCR Core ООО «Лаборатория Изоген» (Россия), содержащий ингибированную для «горячего старта» Taq ДНК полимеразу, дезоксинуклеозид трифосфаты и хлорид магния с конечными концентрациями, соответственно, 1ц, 200 мМ и 2,5 мМ, а так же оптимизированную буферную систему для проведения ПЦР. Конечная концентрация праймеров в реакции 0,1-0,5 мМ, количество ДНК 50-100 ng. Конечный объем ПЦР смеси – 20 мкл. Непосредственно амплификацию осуществляли в термоциклерах «Applied Biosystems 9800 Fast Thermal Cycler» и «Applied Biosystems Veriti 96 Well Fast». Программа амплификации включала в себя следующие стадии: предварительная денатурация 95°C – 5 мин; 8 циклов: денатурация 94°C – 1мин, отжиг 50-60°C – 30с, элонгация - 72°C – 30с; 25 цикл: плавление 94°C – 30с, отжиг 50-60°C – 30с, элонгация - 72°C – 15с. Температуры отжига праймеров по каждому локусу указаны в таблице 1.

Фрагментный анализ (за исключением продуктов локусов *Ots102*, *Omm1037*, *Oki10* и *Ots68*) проводили в вертикальном блоке (длина 21 см) 6% неденатурирующего полиакриламидного геля в 0,5x TBE буфере pH 8,0 при 300В в течение 2-4 часов. Полученные фрагменты визуализировали под УФ-светом в присутствии бромистого этидия (5 мкг/мл). В качестве маркеров длины фрагментов использовали ДНК плазмиды *pBr322* (НПО «СибЭнзим», Россия), обработанную рестриктазами - либо *HaeIII*, либо *HpaII*, либо *Fsp4NI* (НПО «СибЭнзим», Россия). Размеры фрагментов по каждому локусу определяли с использованием программы «Molecular Imaging Software, Version 4.0» фирмы Kodak.

Для фрагментного анализа аллелей локусов *Ots102*, *OMM1037*, *Oki10* и *OtsG68* использовали прибор для капиллярного электрофореза QIAxcel фирмы QIAGEN. Размеры аллелей определялись с использованием ДНК-фрагментов стандартной длины от 52 п.н. до 292 п.н., с шагом 24 п.н., используя программу 'BioCalculator Software' (QIAGEN).

Приложение 2

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов, исследованных на сахалинском таймене

Локус (Ссылка)	Праймеры (5'-3')	Повторяющийся мотив	T_a (°C)	Количество аллелей /ожидаемая гетрозиготность /количество образцов	Размер аллелей (п.н.) локусов амплифицированных с:	
					Новыми праймерами	Оригинальными праймерами [только для полиморфных локусов из Natakeyama et al. (2005) и Korun et al. (2008)]

Новые полиморфные маркеры для сахалинского тайменя

^a указывает праймеры, сконструированных в данном исследовании)

<i>Smm5</i> (Crane et al. 2004)	F: agatgtgtgataaactcagcctc R: agttgtttaaatagggcggatag	(CA) _n C(CA) _m	52	2/0.45/56	~ 80-82	---
<i>Smm17</i> (Crane et al. 2004)	F: aaggatggtgaggacaataca R: accttgagaaatctatatgtgtctc	(CA) _n	52	5/0.38/56	~ 132-140	---
<i>Omy301</i>	F: acttaagactggcaacctt	неизвестна	52	2/0.43/56	~ 70-72	---

(Jackson et al. 1998)	R: ctacacggccttcgggtgaga					
<i>Omm1037</i>	F: gaacggcgactggattaatact ^a					
(Rexroad III et al, 2000)	R: ccgctcacctcgtctcttaa ^a	(GAAA) _n	60	17/0.87/46	~ 207-263	---
<i>Ots102</i>	F: ggatccaataaggagtgatatagtag ^a	(GTCT) _n				
(Nelson, Beacham 1999)	R: tatcccctttaccatttccttgcta ^a	(GCCT) _m	60	4/0.67/46	~ 256-272	---
<i>Oki10</i>	F: gagtgctggacagattggatt ^a					
(Smith et al. 1998)	R: gggagctacagctttttacaaatc ^a	(CTGT) _n	60	16/0.90/47	~ 146-222	---

Полиморфные маркеры из Hatakeyama et al. (2005), амплифицированные с новыми праймерами

<i>Hper-4</i>	F: cacactcatgaccagatataaca ^a	(GT) _n	56	4/0.19/55	~ 98-106	186-188
	R: tcagctgatgtaagaaaggctt ^a					
<i>Hper-6</i>	F: gtaatagcagtcctttgtgaaagtg ^a	(CA) _n	56	2/0.25/49	~101-103	192-194
	R: gtgcatttatccagggtgact ^a					
<i>Hper-8A</i>	F: caaaccacacacactgagct ^a					223-229
	R: atggagtgggctacaatgct ^a	(CA) _n	56	6/0.73/56	~162-178	и 185-187
<i>Hper-16</i>	F: tgggggaggtggcggttt ^a	(GT) _n +(GT) _m	56	5/0.56/55	~134-146	215-219

<i>Hper-25</i>	R: gagaagcacgtattgttttagtgcaa ^a					
	F: gcaggctaaactctaaatgtg ^a	(GA) _n	56	2/0.42/55	~106-112	197-203
	R: catgtatatgtattgcaatctcac ^a					

Полиморфные маркеры из Корун et al. (2008), амплифицированные с новыми праймерами

<i>Pper_1</i>	F: gtaccacactactttgtgcttt ^a	(TGTC) _n	53	29/0.94/55	~ 126-246	~ 156-211
	R: cacagtcagtaaggcagctca ^a					
<i>Pper_2</i>	F: caagtagggatgaatcaacatgtt ^a	(GACA) _n	53	14/0.89/56	~ 162-230	292-348
	R: atgtggccattgttctgatgat ^a					
<i>Pper_3</i>	F: ccactctctctgtattatgt ^a	(GTCT) _n	53	17/0.90/55	~ 146-226	174-310
	R: tgacacacaccggagctagt ^a					
<i>Pper_6</i>	F: gatgtaatttaccttgtgttgactaca ^a	(CA) _n	53	10/0.73/54	~ 105-129	151-177
	R: gtaaagtttcattgccaccacaatca ^a					
<i>Pper_7</i>	F: ggaatcgctgctcaatg ^a	(TG) _n	54	4/0.39/55	~ 128-146	179
	R: tgcagtatgtgtgggtgctct ^a					
<i>Pper_8</i>	F: gagggattaagagatagatatataaaga ^a	(AG) _n	53	5/0.65/55	~ 111-121	118
	R: gtcaatggcaaaaagtatctaagtc ^a					

<i>Pper_11</i>	F: tgtcaggaggacacactgta ^a	(ATGG) _n	53	15/0.87/54	~ 130-210	151-277
	R: gttttgttcagcaccaaatcac					

Мономорфные маркеры

(^a указывает праймеры, сконструированные в данном исследовании)

<i>BleTri4</i> (Froufe et.al. 2004)	F: ctcttgagaggacaccactg R: ccagcttctctggtgggatg	(CAT) _n	52	1/40	~ 78	---
<i>BleTri2</i> (Froufe et.al. 2004)	F: ccaggacatattcccttag R: ccacagctcagggcagggagt	(CAT) _n	56	1/43	~ 95	---
<i>Omm1050</i> (Rexroad III et al. 2000)	F: accaacctgaacacagcctaat ^a R: gctgtaacattcaggatcat ^a	(GATA) _n	60	1/47	~ 156	---
<i>OtsG68</i> (Williamson et al. 2002)	F: tatgaactgcagcttggtatgtagttg ^a R: catgtcggctgctcaagttataa ^a	(GATA) _n (TAGA) _m	60	1/47	~ 129	---
<i>Oki1</i> (Smith et al. 1998)	F: aggatggcagagcaccact R: caccataatcacatattcaga	(CTGT) _n	51	1/50 ^b	~ 118 и ~ 136	---
<i>Ots3</i> (Small et. al. 1998)	F: cacacttttcaggag R: agaatcacaatggaag	(TC) _n	51	1/50	~ 90	---
<i>One103</i> (Olsen et.al. 2000)	F: aatggtgagagctatttcaatcc R: gat tga tga atg ggt ggg	(ATCT) _n Nq (ATCT) _m	51	1/50	~ 78	---

<i>One109</i> (Olsen et.al. 2000)	F: agggagagaagagagggaga R: cctcagaagtagcatcagctc	(TACA)n	51	1/50	~ 105	---
<i>Ssa20.19</i> (Sanchez et.al. 1996)	F: tcaacctggtctgcttcgac R: ctagttccccagcacagcc	(AC)n	52	1/50 ^b	~ 73 и ~ 81	---
<i>Ssa197</i> (Olsen, Seeb 1998)	F: gggttgagtagggaggcttg R: ctagttccccagcacagcc	(GT)nC(TG)p TC(TG)qA (GTGA)m	52	1/50	~ 105	---
<i>Oke11</i> (Buchholz et al. 2001)	F: caaggtgatgcgtgcatacac R: tcattttttgcctgtttctacc	(CA)nGA (CA)m	52	1/50	~ 80	---
<i>Oke3</i> (Buchholz et al. 2001)	F: accctgagagcaatcaac R: tcagggatatgcagtaaatagta	(TCCCTCTC GTCTC)n	50	---	Нет продукта	---
<i>Smm3</i> (Crane et al. 2004)	F: tggctcaaattaagatcctac R: agccattatgcattactgttc	(CA)nCg (CA)m	53	1/50	~ 110	---
<i>Smm24</i> (Crane et al. 2004)	F: cattgatcaagaagccagtgc R: tgtattttgccaatataacacagc	(TATC)n	50	---	Нет продукта	---
<i>Ssol456</i> (Slettan et al. 1997)	F: cttcccaggagtcataaaatct R: taaaccctactgcttggtgagtg	(AC)nAG (AC)m	54	1/50	~ 150	---

^b у каждого образца амплифицировалось два фрагмента, полиморфизм по этим фрагментам между образцами не наблюдался.