

ГЕНЕТИКА, 2012, том 48, № 8, с. 976-982

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.174.015.3:597.553.2

ПАНЕЛЬ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДЛЯ ПОПУЛЯЦИОННЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ САХАЛИНСКОГО ТАЙМЕНЯ *Parahucho perryi* (Brevoort)

© 2012 г. М. В. Шитова¹, А. А. Юрченко¹, Е. Г. Шайхаев^{1 2}, Л. А. Животовский¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991

e-mail: levazh@gmail.com 2000 "Лаборатория Изоген", Москва 119333

Поступила в редакцию 28.12.2012 г.

В данной работе показана положительная кросс-видовая (cross-species) амплификация на образцах ДНК сахалинского тайменя некоторых микросателлитных локусов, описанных ранее для других лососевых рыб (Salmonidae). В работе было проанализировано 56 образцов сахалинского тайменя (*Parahucho perryi*) из рек Даги, Набиль, Поронай и Агнево (о. Сахалин) по 36 микросателлитным локусам, большая часть которых описана для других видов, но на таймене опробованы впервые. Из локусов, впервые опробованных на таймене (21), два локуса не дали продукта амплификации, а 19 успешно амплифицировались (для некоторых конструировали новые праймеры). Из них 13 локусов оказались мономорфными, а шесть полиморфными и затем использовались в дальнейшем популяционно-генетическом исследовании. В дополнение нами были разработаны новые праймеры для уже известных 12 локусов сахалинского тайменя с целью модификации размеров аллелей и оптимизации метода исследования. Еще три локуса были взяты без изменения, что позволило предложить для исследования сахалинского тайменя сводную панель, состоящую из 21 полиморфного микросателлитного маркера, которая опробована на выборках четырех популяций из рек о. Сахалин. Результаты анализа позволяют использовать разработанную панель маркеров для детальных популяционных исследований и оценить уровень генетической дифференциации, инбридинга и миграций у сахалинского тайменя — вида с резко сокращающейся численностью и фрагментированным ареалом и в дальнейшем выделить базовые популяции с целью охраны этого редкого вида.

Сахалинский таймень, *Parahucho perryi* (Brevoort) — это узкоареальный, эндемичный вид Дальнего Востока, занесенный в красную книгу России (присвоена категория — 2, сокращающиеся в численности популяции эндемичного для Дальнего Востока вида) [1], а также в красный список МСОП (Международный союз охраны природы; IUCN Red List of Threatened Animals) — как вид, находящийся в критической опасности из-за сокращающейся 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 [2]. 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 [3—6].

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 сахалинского тайменя обычно не превышает нескольких десятков особей [2]. 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 [7], другой — шесть локусов с ди- и тетра-нуклеотидными повторами [8]. Однако эти два набора не были проанализированы вместе на одних и тех же выборках для оценки совместимости их в популяционном исследовании.

В данной 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 предлагаем набор из 21 микросателлитного локуса, использование которого позволит выявить популяционно-генетическую структуру сахалинского тайменя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе было проанализировано 56 образцов из четырех популяций сахалинского тайменя о. Сахалин, а именно 31, 11, 11 и 3 образца из рек Даги, Набиль, Поронай и Агнево, соответственно. Все экземпляры были собраны осенью 2009 г. Образцы тканей (кусочки плавника) фиксировали в 96%-ном спирте. Выделение ДНК проводили с помощью наборов Diatom DNA prep 200 фирмы ООО "Лаборатория Изоген" (Россия).

Мы протестировали 36 микросателлитных локусов на указанных выборках тайменя, ряд из которых (21 локус) описан для других видов азиатских лососевых рыб (Salmoninae) и на таймене опробован впервые.

Из 21 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 локусов сахалинского тайменя, описанных ранее другими исследователями [7, 8], 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, дезоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния с конечными концентрациями, соответственно, 1 ед. активности, 200 мкМ и 2.5 мМ, а также оптимизированную буферную систему. Конечная концентрация праймеров в реакции 0.1-0.5 мкМ, количество ДНК 50 - 100 нг. 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 - 1 мин, отжиг 50 -60°C - 30 с, элонгация 72°C - 30 с; 25 циклов: плавление 94°C - 30 с, отжиг 50—60°C - 30 с, элонгация 72°C - 15 с.

Температуры отжига праймеров по каждому локусу указаны в табл. 1.

Фрагментный анализ (за исключением продуктов локусов Ots102, OMM1037, Oki10 и OtsG68) проводили в вертикальном блоке (длина 21 см) 6%-ного неденатурирующего полиакриламидного геля в 0.5x TBE буфере pH 8.0 при 300 В в течение 2 - 4 ч. 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 пн до 292 пн, с шагом 24 пн, используя программу "BioCalculator Software" (QIAGEN).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Новые маркеры для сахалинского тайменя. 19 из 21 микросателлитного локуса, описанных для других азиатских лососевых рыб (Salmoninae), успешно амплифицировались на образцах сахалинского тайменя. Тринадцать локусов оказались мономорфными, тогда как остальные шесть были полиморфными с числом аллелей от 2 до 17 и генным разнообразием от 0.38 до 0.90 (табл. 1). Среди этих маркеров наиболее переменными оказались локусы OMM1037 и Ok/10, а наименее переменным — локус Omu301 с двумя аллелями и генным разнообразием 0.43.

Микросателлитные локусы с новыми праймерами. В данном исследовании мы использовали 15 полиморфных микросателлитных локусов, которые были выявлены у сахалинского тайменя [7, 8]. Для 12 из них мы сконструировали новые праймеры в целях модификации размеров аллелей и оптимизации нашего метода исследования (табл. 1).

Дополнительные маркеры. В дополнение ко всему мы проанализировали еще три локуса с оригинальными праймерами, без каких либо доработок: Hper-5 и Hper-15 [7], и Pper_5 [8].

...

Источник: <http://naukarus.com/panel-mikrosatellitnyh-lokusov-dlya-populyatsionnyh-issledovaniy-sahalinskogo-taymenya-parahucho-perryi-brevoort>