

УДК 575.827.2

ДЕЙСТВИЕ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ ЛОКУСЫ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L.)

К. Ю. Зуева¹, М. Ю. Озеров¹, А. Е. Веселов², К. Р. Приммер¹

¹Департамент биологии, подразделение генетики и физиологии,
Университет Турку, Финляндия

²Институт биологии Карельского научного центра РАН

Исследование генетических основ иммунного ответа и, в частности, генетических механизмов, обуславливающих устойчивость или восприимчивость организмов к патогенам, является нетривиальной задачей, требующей особого подхода к выбору объектов и методики исследования. В данной работе мы сравнили действие естественного отбора на иммунокомпетентные и нейтральные локусы атлантического лосося (*Salmo salar* L.). Было показано, что направленный отбор действует с большей интенсивностью на генетические маркеры, связанные с иммунной функцией, чем на нейтральные маркеры. Действие патоген-индуцированного отбора подтверждается также наличием корреляции между частотами аллелей иммунных локусов (EST-маркеры и MHCII) и чувствительностью к паразиту *Gyrodactylus salaris*, а также соленостью и температурой воды. Все маркеры были информативны, что подтверждает применимость EST-локусов для изучения действия естественного отбора, а также свидетельствует в пользу обоснованности использования неравномерной интенсивности отбора в популяциях как «маркера» для поиска генов, кодирующих иммунный ответ организма-хозяина.

Ключевые слова: естественный отбор, эволюция, иммуногенетика, атлантический лосось.

K. Yu. Zueva, M. Yu. Ozerov, A. E. Veselov, C. R. Primmer. NATURAL SELECTION AFFECTING IMMUNE-RELATED LOCI IN ATLANTIC SALMON (*SALMO SALAR* L.)

Revealing the genetic basis of immune response and, particularly, the genetic mechanisms of pathogen resistance or susceptibility is a challenging task, which requires a careful choice of model species and methodology. We compared natural selection pressure affecting immune-relevant and neutral markers of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). The genetic loci associated with immune function were under stronger selective pressure compared to neutral markers. Pathogen-driven selection is additionally indicated by the existing correlation between immune loci (EST-markers and MHCII) allele frequencies and population susceptibility to the parasite *Gyrodactylus salaris*, along with water salinity and temperature. All immune markers were informative, indicating EST-loci might be used for studies of natural selection. Importantly, natural selection itself might be used as a “marker” while searching for genes responsible for host immune response.

Key words: natural selection, evolution, immunogenetics, Atlantic salmon.

Введение

Большинство организмов постоянно находятся под воздействием целого ряда патогенов, в частности паразитов. Устойчивость к паразиту является необходимым условием выживания популяции или же вида-хозяина в целом, в силу чего гены, кодирующие факторы иммунных реакций, а также сцепленные с ними локусы (иммунные локусы) находятся под более интенсивным воздействием естественного отбора, нежели нейтральные маркеры [Lanfegors et al., 2001; Landry, Bernatchez, 2001; Dionne et al., 2007; Fumagalli et al., 2009]. Большинство работ в этом направлении связано с изучением генов главного комплекса гистосовместимости (МНС). МНС содержит гены, обуславливающие определенные стадии иммунного ответа у позвоночных животных, и находится под интенсивным действием естественного отбора [Piertney, Oliver, 2006; Aguilar et al., 2004]. Тем не менее для детального понимания динамики заболеваний и степени, с которой естественный отбор влияет на иммунитет, необходим анализ более широкого спектра иммунных маркеров помимо МНС [Acevedo-Whitehouse, Cunningham, 2006].

Объектом нашего исследования является атлантический лосось (*Salmo salar* L.). Этот вид лососевых рыб интересен с точки зрения исследований патоген-индуцированного отбора и взаимоотношений паразит-хозяин по нескольким причинам. Прежде всего, атлантический лосось является ценным промысловым видом и имеет первостепенное значение с экономической точки зрения. В то же время этот вид достаточно уязвим и требует мер по его сохранению [Asplund et al., 2004]. К настоящему времени атлантический лосось исчез или находится под угрозой исчезновения во многих частях его первоначального ареала. Поэтому популяции северо-запада России и Эстонии, а именно бассейнов Балтийского, Белого и Баренцева морей, чрезвычайно ценны для сохранения этого вида на территории Европы. К факторам, угрожающим лососю, можно отнести чрезмерный вылов, загрязнение водоемов, а также заражение паразитами, например, чрезвычайно опасным представителем плоских червей *Gyrodactylus salaris* (Monogenea). Европейские популяции атлантического лосося характеризуются разной восприимчивостью к *G. salaris*. Одно из возможных объяснений кроется в истории последнего оледенения и последующей реколонизации региона. [Olafsdóttir et al., 2007; Rogers, 2007]. Устойчивость к паразиту у балтийского лосося и почти полная резистентность к нему у ладож-

ской популяции могли возникнуть во время последнего ледникового максимума (приблизительно 26 т. л. н.) как адаптация к совместному существованию в пресноводных рефугиумах [Kuusela et al., 2007, 2009]. Баренцевоморские и беломорские популяции возникли в результате реколонизации этих бассейнов лососем из восточных и западных частей Атлантического океана и, соответственно, остались восприимчивы к паразиту [Asplund et al., 2004; Tonteri et al., 2009]. Эти данные позволяют предположить, что *G. salaris* может быть одним из направляющих факторов отбора по иммунным локусам, действующего с разной интенсивностью в разных по происхождению популяциях. Кроме того, на отбор по иммунным участкам ДНК могут оказывать влияние и характеристики окружающей среды, т. к. с ними связана жизнеспособность паразита. Например, выживаемость *G. salaris* падает пропорционально росту солености [Bakke, 2002]. Температура также является важным фактором, т. к. видовое разнообразие паразитов увеличивается с севера на юг [Guernier et al., 2004; Tonteri et al., 2010].

Не менее важен и тот факт, что для лососевых рыб на данный момент наработано большое количество молекулярных данных, например EST-гены (короткие последовательности комплементарной ДНК, расположенные рядом или в кодирующих частях генома); некоторые из них связаны с иммунным ответом [Vasemagi et al., 2005; Tonteri et al., 2008].

В настоящей работе мы продолжили исследование, начатое Анни Тонтери (Anni Tonteri) с соавторами [Tonteri et al., 2010]. В нем рассматривался вопрос, испытывают ли 18 микросателлитных локусов, сцепленных с иммунными генами, более интенсивное давление естественного отбора по сравнению с нейтральными маркерами (без известной функции). Кроме того, была изучена степень корреляции характеристик окружающей среды с иммунными маркерами, в сравнении с нейтральными локусами. Как и предполагалось, было показано, что отбор оказывает более выраженное действие на иммунные локусы; также была выявлена корреляция частот аллелей иммунных локусов с температурой воды и географической широтой. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что несущие иммунную функцию участки ДНК находятся под более интенсивным действием естественного отбора, нежели нейтральные маркеры. Тем не менее эти результаты нуждаются в дополнительной проверке, желательно с использованием большей выборки, что и стало целью настоящего исследования.

В данной работе мы увеличили число анализируемых популяций лосося до 17 (включая 8 популяций, исследованных Tonteri et al., 2010). Изученные популяции лосося нерестятся в реках северо-западной России и Эстонии и значительно различаются по степени чувствительности к *Gyrodactylus salaris*. Помимо этого водные бассейны также отличаются по солености и температуре. В сравнении с предыдущим исследованием были дополнительно проанализированы такие характеристики, как температура воды в зимний период (январь) и температура воздуха летом (июль) и зимой (январь). Кроме того, чтобы выявить локусы, значительно отклоняющиеся от остальных по степени действия на них естественного отбора, мы использовали метод, основанный на иерархическом анализе [Excoffier et al., 2009].

Корреляция напряженности естественного отбора с функциями генов – чрезвычайно важная и интересная область исследований. Целью данной работы являлось выяснение зависимости напряжения естественного отбора от

функции использованных маркеров. Ее раскрытие позволит внести важный вклад в понимание межпопуляционных различий, обусловленных чувствительностью атлантического лосося к паразиту *Gyrodactylus salaris*.

Материалы и методы

Пробы и генетические маркеры

Всего было изучено 417 особей атлантического лосося, воспроизводящегося в 17 реках бассейнов Ладожского озера, Балтийского, Белого и Баренцева морей (рис. 1). Пробы молоди были собраны с помощью электролова (Fa-2, Норвегия) в период с 1997 по 2005 гг. Методика выделения ДНК описана в работе А. Тонтери с соавторами [Tonteri et al., 2005, 2009].

Всего было исследовано 19 микросателлитных маркеров, включая 12 иммунных и 7 нейтральных локусов (табл. 2). Для десяти маркеров связь с иммунной системой была показана ранее [Tonteri et al., 2008]. Иммунокомпетентный

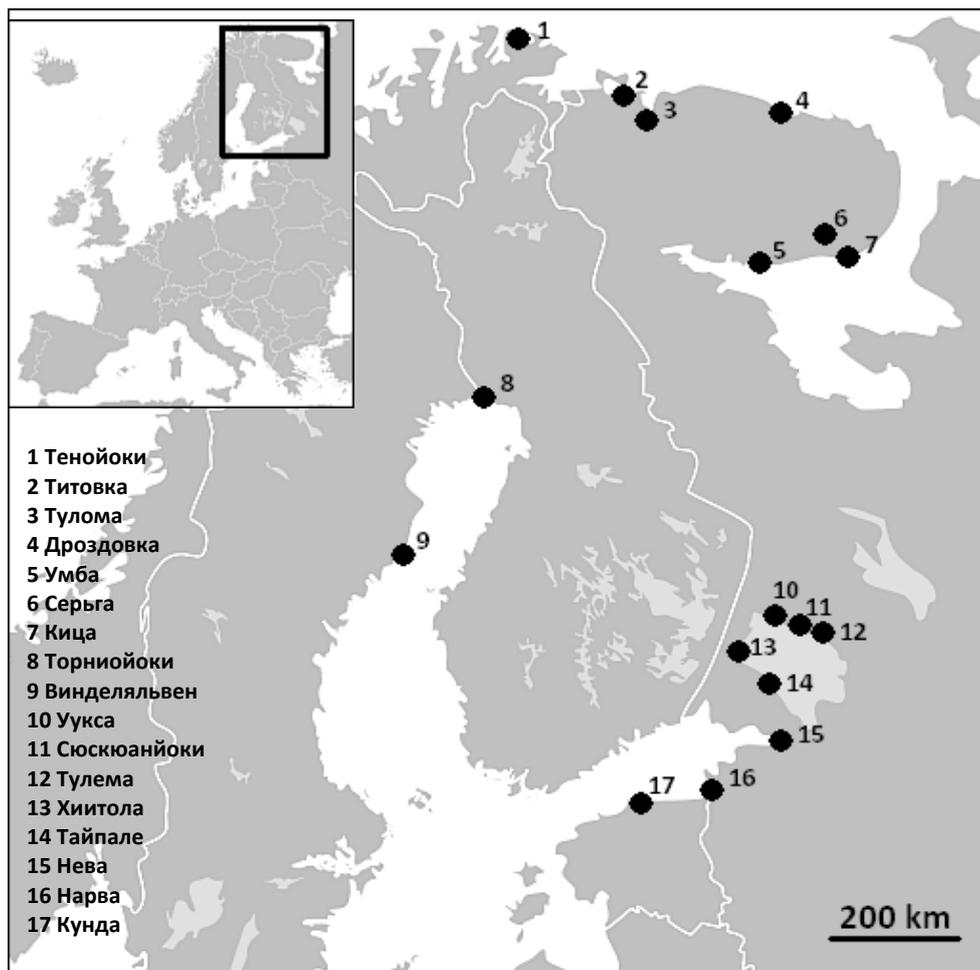


Рис. 1. Географическое местоположение исследованных популяций.

локус EST22 был найден и описан А. Вяссемяги с соавторами [Vasemägi et al., 2005]. Кроме того, в анализ был включен один минисателлитный MHCII-маркер [Stet et al., 2002]. Девять новых популяций (Тулема, Хиитола, Уукса, Кунда, Нарва, Нева, Титовка, Дроздовка и Умба) были изучены по 12 иммунным локусам. Детальная информация о нейтральных локусах приведена в работе А. Тонтери [Tonteri et al., 2009].

Методы амплификации и последующего анализа микросателлитных локусов на секвенаторе ABI Prism 3130x1 (Applied Biosystems) описаны ранее [Tonteri et al., 2008; Vasemägi et al., 2005]. Генотипы по нейтральным локусам для всех популяций, а также по иммунным локусам для восьми популяций (реки Сюскюанйоки, Тайпале, Торнийоки, Винделяльвен, Тенойоки, Тулома, Кица, Серьга) были также получены в ходе предыдущих исследований [Tonteri et al., 2005, 2007; Ozerov et al., 2010].

Анализ данных

Степень генетического полиморфизма оценивалась по общему числу аллелей (A), числу аллелей, усредненному по минимальной выборке (AR), показателям наблюдаемой (H_O) и

ожидаемой (H_E) гетерозиготности по каждому локусу, подсчитанным с использованием программы Fstat 2.93 [Goudet, 1995].

Все используемые маркеры были проверены на отклонение от генетического равновесия по Харди-Вайнбергу (ХВ) и на отсутствие неравновесия по сцеплению с помощью программы Genepop 4.0 [Raymond, Rosset, 1995].

Исследованные популяции характеризуются разным географическим положением и разным уровнем чувствительности к *Gyrodactylus salaris* (табл. 1). Основываясь на данных различиях, мы объединили все популяции в три группы: 1) Баренц-беломорские, 2) Балтийские и 3) Ладожские. Пресноводный лосось Ладожского озера (реки Сюскюанйоки, Тайпале, Хиитола, Тулема и Уукса) практически не восприимчив к паразиту [Kuusela et al., 2009], проходные популяции Балтийского моря (реки Нева, Нарва, Кунда, Торнийоки, Винделяльвен) показывают средний уровень восприимчивости [Bakke, 1990; 1992; 2004]. Наконец, восприимчивость проходных популяций Баренцева и Белого морей (Тенойоки, Титовка, Тулома, Дроздовка, Умба, Кица, Серьга) к *G. salaris* чрезвычайно высокая [Bakke, 1990, 1992, 2004; Kudersky et al., 2003], что позволило объединить их в группу «Баренц-беломорские».

Таблица 1. Популяции атлантического лосося, параметры окружающей среды, показатели генетического разнообразия

Популяции	Группа	Координаты		Смертность, %	Соленость ‰	Т, °С, вода июль	Т, °С, вода январь	Т, °С, воздух июль	Т, °С, воздух январь	N	A	H_E	H_O
Тулема	Ладожские	61°21'	31°50'	0	0	14,3	1,4	16	-9	32	4,2	0,40	0,38
Хиитола	Ладожские	61°10'	29°52'	0	0	14,3	1,4	16	-8	35	4,2	0,40	0,39
Уукса	Ладожские	61°29'	31°36'	0	0	14,3	1,4	16	-9	28	6,2	0,35	0,40
Сюскюанйоки*	Ладожские	61°39'	31°16'	0	0	14,3	1,4	16	-9	26	3,4	0,34	0,34
Тайпале*	Ладожские	60°37'	30°30'	0	0	14,3	1,4	16	-8	29	4,7	0,39	0,40
Кунда	Балтийские	59°31'	26°32'	10	5	17,1	0,7	17	-5	29	5,1	0,37	0,37
Нарва	Балтийские	59°28'	28° 2'	10	4	17,1	0,7	17	-7	31	3,3	0,41	0,44
Нева	Балтийские	59°55'	30°14'	10	2	17,9	2	17	-8	25	4,8	0,47	0,46
Торнийоки*	Балтийские	65°48'	24° 8'	10	3	16,1	1	15	-7	19	5,2	0,47	0,46
Винделяльвен*	Балтийские	63°44'	20°19'	10	5	14,4	1	15	-10	26	5,3	0,46	0,47
Титовка	Баренц-беломорские	69°35'	32° 5'	98	25	7,5	3,5	10	-6	30	4,9	0,56	0,55
Дроздовка	Баренц-беломорские	68°21'	38°19'	98	25	7,5	3,5	8	-8	39	3,2	0,51	0,49
Умба	Баренц-беломорские	66°38'	34°22'	98	26	13	0	13	-11	41	4,2	0,51	0,51
Кица*	Баренц-беломорские	66°29'	36°53'	98	26	13	0	12	-11	33	4,7	0,56	0,54
Серьга*	Баренц-беломорские	66°36'	36°34'	98	26	13	0	12	-11	21	4,9	0,55	0,47
Тенойоки*	Баренц-беломорские	70°31'	28°22'	98	25	7,5	3,5	10	-4	16	5,6	0,51	0,48
Тулома*	Баренц-беломорские	69°16'	33°30'	98	25	7,5	3,5	10	-6	32	3,9	0,58	0,53

Примечание. * – популяции, использованные также в работе А. Тонтери с соавторами [Tonteri et al., 2010], смертность в присутствии паразита *G. salaris* (в процентах от общего числа зараженных особей), N – число особей, A – среднее число аллелей на локус в популяции, H_E – ожидаемая гетерозиготность, H_O – наблюдаемая гетерозиготность

Методы определения, находится ли локус под влиянием естественного отбора, использованные в данной работе, опираются на предположение, что степень генетической дифференциации между популяциями (*FST*) повышена для локусов, на которые отбор действует с разной интенсивностью в разных популяциях [Beaumont, Nichols, 1996; Beaumont, Balding, 2004]. Первый использованный тест основан на алгоритме Байеса с применением цепей Маркова и реализован в программе *BAYESFST* [Beaumont, Balding, 2004]. Анализ был проведен как для всей выборки в целом, так и для каждой из трех групп популяций. Реализованный в *BAYESFST* алгоритм позволяет выявить локусы, подвергшиеся как направленному, так и балансирующему отбору. Однако было показано, что положительные результаты по балансирующему отбору не всегда достаточно достоверны [Beaumont, Balding, 2004]. Также используемая в программе *BAYESFST* модель может приводить к ложноположительным результатам, в случае если анализируемые особи принадлежат популяциям, представляющим собой некую иерархическую структуру или имеющим общую историю [Excoffier et al., 2009]. Чтобы преодолеть упомянутые трудности и уменьшить число ложноположительных результатов, мы также использовали метод, основанный на иерархической островной модели популяций [Slatkin, Voelm, 1991], реализованный в программе *ARLEQUIN 3.5* [Excoffier, Lischer, 2010]. Иерархическая структура нашей выборки следующая. Три группы проб, каждая из которых

состоит из проб отдельных популяций: 1) Ладожские (Сюскоянойки, Тайпале, Хиитола, Тулема и Уукса), 2) Балтийские (Нева, Нарва, Кунда, Торнойоки, Винделяльвен), 3) Баренц-беломорские (Тенойоки, Титовка, Тулома, Дроздовка, Умба, Кица, Серьга).

При проверке гипотезы о том, что некоторые факторы окружающей среды (табл. 1) могут влиять на отбор, мы использовали метод пространственного анализа (the spatial analysis method, *SAM*) [Joost et al., 2007]. Данный тест основан на множественных логистических регрессиях, которые позволяют провести анализ корреляции между частотами аллелей локуса и заданной характеристикой среды. Затем мы сравнивали количество аллелей, показавших корреляцию с данной переменной, между иммунными и нейтральными маркерами, используя тест Хи-квадрат.

Информация об уровне смертности при гидроактилизе у разных популяций атлантического лосося была получена из ранее опубликованных работ [Kuusela et al., 2007; Bakke et al., 2004]. Данные по солености, средней температуре воды и воздуха взяты из открытых источников [www.nodc.noaa.gov; www.gks.ru].

Результаты

Среди иммунных локусов среднее количество аллелей на локус (*AM*) составило 2,9; от 1,5 (*Ssal006*) до 6,3 (*MHCII*) (табл. 2). Показатели наблюдаемой (*H_o*) гетерозиготности изменялись от 0,02 (*Ssal006*) до 0,64 (*MHCII*), тогда как ожи-

Таблица 2. Микросателлитные локусы и показатели генетической изменчивости

Локусы	Количество локусов	<i>A_T</i>	<i>A_M</i>	<i>A_R</i>	<i>H_E</i>	<i>H_O</i>
Нейтральные	7	153	7,5	6,2	0,81	0,71
<i>Ssa171</i>		20	7,9	9,3	0,79	0,70
<i>Ssa197</i>		32	10,3	13,4	0,92	0,81
<i>Ssa85</i>		24	8,7	11,8	0,89	0,82
<i>SSOSL311</i>		30	10,8	14,9	0,93	0,89
<i>SSOSL438</i>		13	4,6	5,4	0,67	0,57
<i>SSOSL85</i>		28	7,3	10,4	0,86	0,71
<i>Ssa412</i>		6	3,1	3,5	0,59	0,49
Иммунные	12	88	2,9	2,6	0,39	0,30
<i>Ssal002</i>		9	2,7	2,5	0,44	0,40
<i>Ssal003</i>		8	3,5	3,2	0,59	0,42
<i>Ssal004</i>		5	2,1	2,1	0,32	0,21
<i>Ssal005</i>		3	2,0	2,0	0,35	0,33
<i>Ssal006</i>		7	1,5	1,1	0,02	0,02
<i>Ssal007</i>		6	2,0	1,8	0,17	0,16
<i>Ssal008</i>		5	2,7	2,3	0,49	0,36
<i>Ssal009</i>		4	2,4	1,9	0,25	0,18
<i>Ssal010</i>		4	2,2	2,1	0,26	0,18
<i>Ssal011</i>		5	2,8	2,6	0,51	0,47
<i>MHCII</i>		13	6,3	6,0	0,85	0,64
<i>Est22</i>		19	4,3	3,2	0,478	0,235
Всего локусов	19	241	4,6	5,2	0,55	0,45

Примечание. *A_T* – общее число аллелей в локусе, *A_M* – среднее число аллелей в локусе на популяцию, *H_E* – ожидаемая гетерозиготность, *H_O* – наблюдаемая гетерозиготность, *A_R* – число аллелей, усредненное по минимальной выборке. Жирным шрифтом выделены средние значения генетической изменчивости по нейтральным, иммунным и всем локусам

даемая (H_E) гетерозиготность составила от 0,02 до 0,85 (те же локусы). Усредненные показатели по всем локусам составили: $H_O = 0,30$ и $H_E = 0,39$. Для нейтральных маркеров среднее число аллелей на локус (A_M) составило 7,5 – в пределах от 3,1 (Ssa171) до 10,8 (SSOSL311). Значения наблюдаемой гетерозиготности (H_O) изменялись от 0,49 (SSOSL438) до 0,89 (SSOSL311), среднее 0,71. Ожидаемая гетерозиготность изменялась в пределах 0,59–0,93, при среднем значении 0,80. Число аллелей, усредненное по минимальной выборке (A_R), для иммунных локусов составило 2,6 и 6,2 для нейтральных. Средняя наблюдаемая гетерозиготность по всем локусам в пределах одной популяции (H_O) колебалась от 0,34 (Сюскюанйоки) до 0,55 (Титовка), а ожидаемая гетерозиготность (H_E) – от 0,34 (Сюскюанйоки) до 0,58 (Тулома) (табл. 1).

Два локуса (EST22 и MHCII) отклонялись от генетического равновесия по Харди-Вайнбергу. Однако это отклонение было достоверно только для двух популяций (Умба и Кица). После повторного проведения теста без этих популяций все локусы находились в состоянии генетического равновесия по Харди-Вайнбергу, в связи с чем мы не стали исключать локусы EST22 и MHCII из последующего анализа. Анализ по всем популяциям, с применением коррекции Бонферрони для множественных тестов, показал неравновесие по сцеплению для девяти пар маркеров (из 171). Каждая из девяти сцепленных пар локусов наблюдалась в разных популяциях, и, таким образом, это не могло достоверно повлиять на результаты межпопуляционного и межрегионального анализа.

Было показано, что шесть локусов (SsaI004, SsaI010, SSOSL311, Ssa171, SSOSL85, EST22) находятся под влиянием отбора по результатам по крайней мере одного из двух тестов (табл. 3).

Тест BAYESFST выявил пять локусов, на которые действует отбор (для четырех локусов – с вероятностью 99 %): два из них нейтральные, подверженные балансирующему отбору (SSOSL311, Ssa171), и три – иммунные (SsaI004, SsaI010, EST22), подверженные направленному отбору (рис. 2). Иерархический метод, примененный в ARLEQUIN 3.5, также выявил локусы, находящиеся под действием естественного отбора: один иммунный локус (SsaI004) с вероятностью 99 % (направленный отбор) и три локуса с вероятностью 95 % (один нейтральный под действием балансирующего отбора (SSOSL311), один иммунный (SsaI010) и один нейтральный (SSOSL85) под действием направленного отбора) (рис. 3). Объединенные данные двух тестов показали признаки усиленного действия направленного отбора на два

иммунных (16,7 % от общего числа) и один нейтральный локусы (14,3 %). Однако данные различия между типами локусов при объединении двух тестов статистически не достоверны, $P = 0,64$ (табл. 3).

Таблица 3. Количество локусов, находящихся под влиянием естественного отбора по результатам двух тестов

Локусы	BAYESFST, %	Иерархический тест, %	Оба теста, %
Иммунные	3 SsaI004 (P 0,01) SsaI010 (P 0,01) Est22 (P 0,01)	25,0 2 SsaI004 (P 0,01) SsaI010 (P 0,05)	16,7 2 SsaI004 (P 0,01) SsaI010 (P 0,01)
Нейтральные	2 SSOSL311 (P 0,01) Ssa171 (P 0,05)	28,6 2 SSOSL311 (P 0,05) SSOSL85 (P 0,05)	14,3 1 SSOSL311 (P 0,01)
Хи ² , значение P	0,57	0,04	0,64

Примечание. Жирным шрифтом выделены локусы, находящиеся под действием направленного отбора. Достоверность различия количества иммунных и нейтральных локусов, находящихся под действием естественного отбора, была протестирована с помощью метода Хи²

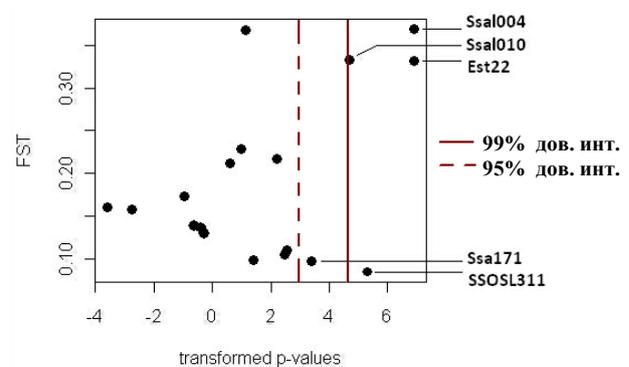


Рис. 2. Результаты теста, основанного на модели Байеса (BAYESFST), для объединенной Ладужской, Баренц-беломорской и Балтийской выборки. На рисунке представлены значения F_{ST} и соответствующие значения вероятностей P для каждого маркера (черные точки). Вертикальные линии обозначают 95-процентный (левая) и 99-процентный (правая) доверительные интервалы.

Анализ пространственных характеристик (SAM тест) выявил, что число иммунных аллелей, коррелирующих со смертностью, соленостью, географической долготой, а также с температурой воды и температурой воздуха в июле, достоверно выше, чем число нейтральных аллелей (табл. 4).

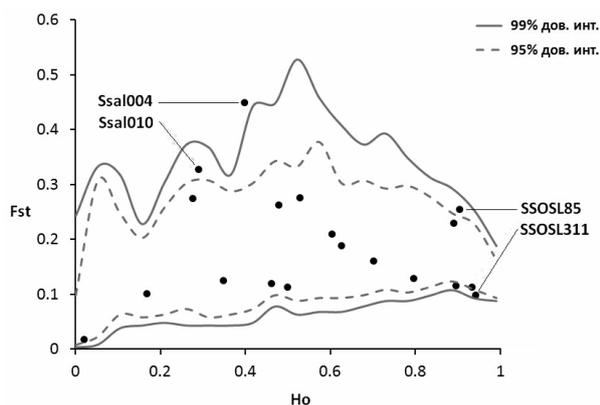


Рис. 3. Результаты иерархического теста (Arlequin 3.5). На оси нанесены значения генетической дифференциации (F_{ST}) и наблюдаемой гетерозиготности (H_o) для каждого маркера (черные точки). Кривые отражают 99-процентный (внешняя пара, сплошная линия) и 95-процентный (внутренняя пара, пунктирная линия) доверительные интервалы.

Таблица 4. Корреляция молекулярных маркеров и параметров окружающей среды

Локусы	Смертность	Соленость	Широта	Долгота
Иммунные	17 [19,3]	17 [19,3]	15 [17]	14 [15,9]
Нейтральные	11 [7,1]	11 [7,2]	14 [9,1]	8 [5,2]
χ^2 , P-значения	0,005	0,005	0,070	0,006
Локусы	Температура воды (июль)	Температура воды (январь)	Температура воздуха (июль)	Температура воздуха (январь)
Иммунные	10 [11,4]	0	15 [17]	4 [4,5]
Нейтральные	6 [3,9]	8 [5,2]	13 [8,5]	9 [5,9]
χ^2 , P-значения	0,025	0,029	0,046	0,658

Примечание. В таблице указаны число и процент [в скобках] аллелей, коррелирующих с характеристиками окружающей среды

Обсуждение

В целом результаты нашей работы подтверждают высказанные ранее гипотезы о том, что локусы, связанные с генами, кодирующими факторы иммунного ответа, подвергаются влиянию естественного отбора более интенсивно, нежели нейтральные [Langefors et al., 2001; Landry, Bernatchez, 2001; Dionne et al., 2007; Fumagalli et al., 2009]. Однако при объединении результатов двух проведенных тестов не было выявлено достоверно большего количества иммунных локусов, подверженных усиленному действию отбора, по сравнению с нейтральными, что противоречит данным, полученным ранее

[Tonteri et al., 2010]. Тем не менее подобная тенденция существует (16,7 % иммунных локусов подвержены действию отбора, по сравнению с нейтральными – 14,3 %). Более того, те локусы, которые в нашей работе находились за пределами доверительного интервала по результатам одного из двух тестов (Ssa1004, Ssa1010, SSOSL311, EST22, Ssa171), также были выявлены ранее (Tonteri et al., 2010) (рис. 2). Кроме того, мы применили алгоритм BAYESFST отдельно для трех групп популяций (Баренц-беломорские, Ладожские, Балтийские). Для Баренц-беломорских было показано, что отбор усиленно действует на локус EST22, в Ладожских – на локусы SSOSL85 и SSOSL311, в Балтийских – на локусы SSOSL311 и Ssa197. Таким образом, два локуса (Ssa197, SSOSL85) не были выявлены при объединении всех популяций для проведения тестов, а некоторые локусы (Ssa1004, Ssa1010, Ssa171) достоверно выходили за пределы доверительного интервала только при применении неструктурированной модели популяции для теста. С другой стороны, один из локусов, претерпевающий усиленное действие отбора (Ssa1002) и достоверно выходящий за пределы доверительного интервала согласно результатам предыдущего анализа (Tonteri et al., 2010), не был выявлен в ходе наших исследований.

Наблюдаемые различия в результатах, полученных с помощью разных тестов, можно объяснить следующим образом. В целом естественный отбор может приводить к генетической дифференциации между популяциями. Частоты аллелей локусов, находящихся под влиянием балансирующего отбора, будут равными между различными популяциями, в то время как частоты аллелей локусов, находящихся под сильным локальным действием направленного отбора, будут значительно изменяться между популяциями [Cavalli-Sforza, Edwards, 1967; Lewontin, Krakauer, 1973]. Данное заключение легло в основу тестов, сравнивающих степень генетической изменчивости внутри популяции и степень дифференциации между популяциями [Beaumont, Balding, 2004]. Предположительно, генетические различия между популяциями по локусам, претерпевающим давление направленного отбора, будут довольно сильными [Beaumont, Balding, 2004]. Таким образом, если генетическое различие по определенному маркеру сильно отличается от ожидаемого при нейтральной модели, можно предположить, что данный маркер находится под влиянием естественного отбора [Oleksyk et al.,

2010]. Описанный метод позволяет рассчитать значения *FST* исходя из нейтральной модели структуры популяции и построить ожидаемое распределение данных значений, основанное на первоначальных частотах аллелей. Этот подход был применен в программе *BAYESFST*. Тем не менее было показано, что использование данного метода приводит к достаточно большому числу ложноположительных результатов, если анализируемые выборки были отобраны из иерархически организованной популяции [Excoffier et al., 2009]. С увеличением числа исследуемых популяций точность расчета показателя *FST* должна увеличиваться, а границы доверительного интервала – сужаться. Так, если какие-то из анализируемых популяций не являются независимыми, т. е. их дивергенция произошла относительно недавно, доверительные интервалы, вычисленные исходя из гипотезы о том, что генетические расстояния между популяциями равны, будут слишком узкими, и часть локусов будет ложно признана отклоняющимися от ожидаемых значений [Excoffier et al., 2009]. Это доказывает важность применения иерархического метода, учитывающего внутривидовую структуру. Результаты нашей работы согласуются с описанной теорией, т. к. некоторые локусы, для которых ранее было показано влияние отбора (*SSOSL311*, *Ssa1010*, *EST22*), не вошли в 99-процентный доверительный интервал после применения иерархического теста. Тем не менее даже после удвоения выборки в нашей работе полученные результаты согласуются с результатами предыдущего анализа (Tonteri et al., 2010). Это позволяет предположить, что локусы, для которых показано действие отбора, действительно испытывают усиленное влияние естественного отбора.

С другой стороны, наше исследование не выявило корреляции между интенсивностью отбора и функциональной ролью маркера. Но принимая во внимание, что мы анализировали только 7 нейтральных маркеров по сравнению с 62 в предыдущей работе [Tonteri et al., 2010], отсутствие корреляции, скорее всего, связано с недостатком выборки нейтральных маркеров. Также в своей работе А. Тонтери с соавторами [Tonteri et al., 2010] использовали дополнительный тест (*lnRH*) [Schlötterer, 2002; Kauer et al., 2003], основанный на предположении, что для локусов, находящихся под влиянием отбора, характерен более низкий уровень генетического разнообразия, чем для нейтральных. Таким образом, различия в результатах также могут объясняться использованием разных аналитических методов.

SAM тест выявил, что иммунные локусы чаще коррелируют со степенью чувствительности к *G. salaris* (с уровнем смертности в результате заражения), нежели нейтральные, что может являться признаком патоген-индуцированного отбора. Факт, что подобная корреляция наблюдается и с соленостью воды, подтверждает данное предположение. По одним данным, увеличение солености воды до 5 ‰ не влияет на рост и жизнеспособность паразита *G. salaris* [Soleng, Bakke, 1997]. По другим – увеличение солености вплоть до изоосмотической точки (немногом менее 7,5 ‰) может даже увеличивать жизнеспособность паразита, за счет уменьшения его затрат на поддержание осмотического баланса [Harris et al., 1998, цит. по Bakke, 2002]. Таким образом, в солоноватой воде паразит может выживать даже на неподходящем хозяине. По-видимому, такая ситуация имеет место в Балтийском море, где *G. salaris* может выживать на радужной форели при солености около 5 ‰ [Malmberg, 1989]. При увеличении солености (7,5–33 ‰) время жизни паразита сокращается [Soleng, Bakke, 1997]. В то же время в пресной воде (Ладожское озеро) паразит присутствует постоянно, и поэтому Ладожские популяции атлантического лосося постоянно сталкиваются с необходимостью противостоять ему. Это может выражаться в высокой напряженности иммунной системы рыбы и, как результат, в низкой чувствительности к паразиту.

Балтийские популяции лосося характеризуются средним уровнем восприимчивости к *G. salaris*. Одно из возможных объяснений этого следующее: паразит постоянно присутствует в реках («пресноводные» условия), но когда лосось скатывается в Балтийское море, часть паразитов умирает из-за повышения солености, и популяция лосося освобождается из-под гнета патогена, что ослабляет действие отбора на иммунные локусы. В результате мы видим различия в корреляции между иммунными локусами и соленостью при сравнении пресноводных и морских популяций. Тем не менее данное объяснение не может быть применено к Баренц-беломорским популяциям, так как они, вероятно, никогда не сталкивались с *G. salaris* в естественных условиях. Кроме вызванных человеком случаев, в результате которых вся инфицированная популяция погибала или находилась на критически низком уровне воспроизводства [Bakke, 1990, 1992, 2004; Kudersky et al., 2003]. Безусловно, необходимы более детальные исследования уровня восприимчивости к *G. salaris* лосося из зон с разной соленостью и географическим положением.

В предыдущем исследовании значения корреляции иммунных локусов и температуры воды были близки к достоверным. Проведенный нами анализ подтверждает данную тенденцию: $P = 0,025$ и $0,029$ для температуры воды в июле и январе. Кроме того, когда мы объединили данные по температуре воды и воздуха, различия между зимним и летним сезонами также стали достоверными: иммунные маркеры коррелировали с летней температурой [$P = 0,002$], но не с зимней [$P = 0,082$]. Многие исследования показывают, что количество паразитов, так же как и общее видовое разнообразие, увеличивается с повышением температуры, что справедливо как для водных [Dionne et al., 2007], так и для наземных [Moysa-Laraño, 2010] экосистем. Необходимость противостоять более разнообразным и многочисленным паразитам может приводить к более выраженной эволюции иммунных систем видов-хозяев, что в нашем случае выражается в наличии корреляции между иммунными локусами и температурой.

Интересным наблюдением можно считать тот факт, что не была выявлена корреляция между иммунными локусами и географической широтой, вопреки результатам А. Тонтери [Tonteri et al., 2010]. Напротив, была показана корреляция данных маркеров с географической долготой. Зависимость частоты иммунных аллелей от географической широты вполне ожидаема, т. к. температура воды и воздуха растет при движении с севера на юг. Например, для атлантического лосося у берегов Канады генетическая изменчивость МНС-генов увеличивается с ростом температуры вдоль широтного градиента в ответ на давление патоген-индуцированного отбора [Dionne et al., 2007]. Возможно, объяснение полученных нами результатов кроется в географическом расположении использованных для анализа популяций. Для целей текущего исследования мы добавили к предыдущей выборке три популяции из южных районов Балтийского моря (Нева, Нарва, Кунда), нарушив тем самым имевшийся ранее широтный характер распределения значений солёности, температуры и смертности. Однако, принимая во внимание, что мы анализировали только 7 нейтральных локусов против 62 в предыдущем исследовании [Tonteri et al., 2010], разница в полученных результатах может объясняться недостатком нейтральных маркеров в анализе. Таким образом, корреляция иммунных локусов с географической долготой ставится нами под сомнение, и на данный момент остается неясным, что является основным параметром, с которым коррелируют иммунные маркеры, – температура воды или же географическая широта.

Заключение

Представленные в данной работе результаты подтверждают предположение, что связанные с иммунным ответом локусы находятся под усиленным действием естественного отбора, по сравнению с маркерами, не несущими ярко выраженной иммунной функции. Наличие связи между иммунными локусами и солёностью, температурой воды, а также чувствительностью к паразиту *Gyrodactylus salaris* также свидетельствует о действии патоген-индуцированного отбора. Основываясь на данных выводах, становится возможным использовать неравномерную интенсивность отбора в популяциях как маркер для поиска генов, связанных с иммунным ответом. Более того, такой подход применим ко всему геному и способствует поиску ранее неизвестных иммунокомпетентных локусов. В настоящей работе как EST-маркеры, так и МНСII-локус были информативны, что еще раз свидетельствует в пользу применимости широкого спектра локусов для изучения влияния естественного отбора на участки генома, связанные с иммунным ответом.

Работа выполнена в рамках программы Отделения биологических наук «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» по теме «Разработка экспертной системы “Лососевые популяции и нерестовые реки Восточной Фенноскандии” на основе ГИС-технологий».

Литература

- Acevedo-Whitehouse K., Cunningham A. Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? // Trends in Ecology & Evolution. 2006. Vol. 21. P. 433–438.
- Aguilar A., Roemer G., Debenham S., Binns M., Garcelon D., Wayne K. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal // PNAS. 2004. Vol. 101. P. 3490–3494.
- Asplund T., Veselov A. J., Primmer C. R., Bakhmet I., Potutkin A., Titov S., Zubchenko A., Studenov I., Kaluzhchin S., Lumme J. Geographical structure and postglacial history of mtDNA haplotype variation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) among rivers of the White and Barents Sea basins // Ann. Zool. Fennici. 2004. Vol. 41. P. 465–475.
- Bakke T., Jansen P., Hansen L. Differences in the host resistance of Atlantic salmon *Salmo salar* L., stocks to the monogenean *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 // Journal of Fish Biology. 1990. Vol. 37. P. 571–581.
- Bakke T. A., Harris P. D., Jansen P. A., Hansen L. P. Host specificity and dispersal strategy in gyrodactylid monogeneans, with particular reference to *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) // Diseases of Aquatic Organisms. 1992. Vol. 13, N 1. P. 63–74.

- Bakke T., Harris P. D., Cable J. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans // International Journal for Parasitology. 2002. Vol. 32. P. 281–308.
- Bakke T. A., Harris P. D., Hansen H., Cable J., Hansen L. P. Susceptibility of Baltic and East Atlantic salmon *Salmo salar* stocks to *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) // Diseases of Aquatic organisms. 2004. Vol. 58. P. 171–177.
- Beaumont M., Nichols R. A. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure // Proceedings of the Royal Society of London. 1996. Vol. 263. P. 1619–1626.
- Beaumont M., Balding D. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans // Molecular Ecology. 2004. Vol. 13, N 4. P. 969–980.
- Cavalli-Sforza L. L., Edwards A. W. F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures // American Journal of Human Genetics. 1967. Vol. 19. P. 233–257.
- Dionne M., Miller K., Dodson J., Caron F., Bernatchez L. Clinical variation in MHC diversity with temperature: evidence for the role of host-pathogen interaction on local adaptation in Atlantic salmon // Evolution. 2007. Vol. 61. P. 2154–2164.
- Excoffier L., Hofer T., Foll M. Detecting loci under selection in a hierarchically structured population // Heredity. 2009. Vol. 103. P. 285–298.
- Excoffier L., Lisher H. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Molecular Ecology Resources. 2010. Vol. 10, N 3. P. 564–567.
- Fumagalli M., Cagliani R., Pozzoli U., Riva S., Comi G., Menozzi G., Bresolin N., Sironi M. Widespread balancing selection and pathogen-driven selection at blood group antigen genes // Genome Resources. 2009. Vol. 19. P. 199–212.
- Goudet J. FSTAT [Version 1.2]: A Computer Program to Calculate F-Statistics // Heredity. 1995. Vol. 86. P. 485–486.
- Guernier V., Hochberg M. E., Guégan J.-F. Ecology Drives the Worldwide Distribution of Human Diseases // PLoS Biology. 2004. 2, N 6: e141. doi:10.1371/journal.pbio.0020141.
- Joost S., Bonin A., Bruford M. W., Despres L., Conord C., Erhardt G., Taberlet P. A spatial analysis method [SAM] to detect candidate loci for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation // Genetics. 2007. Vol. 127. P. 627–629.
- Kauer M. O., Dieringer D., Schlötterer C. A microsatellite variability screen for positive selection associated with the «out of Africa» habitat expansion of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 2003. Vol. 165. P. 1137–1148.
- Kudersky L. A., Ieshko E., Schulman B. Distribution range formation history of the monogenean *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 – a parasite of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) // Atlantic salmon: biology, conservation and restoration. 2003. Petrozavodsk, P. 76–83.
- Kuusela J., Zietara M. S., Lumme J. Hybrid origin of Baltic salmon-specific parasite *Gyrodactylus salaris*: a model for speciation by host switch for hemiclinal organisms // Molecular Ecology. 2007. Vol. 16, N 24. P. 5234–5245.
- Kuusela J., Holopainen R., Meinilä M., Anttila P., Koski P., Zietara M. S., Veselov A. J., Primmer C. R., Lumme J. Clonal structure of salmon parasite *Gyrodactylus salaris* on a coevolutionary gradient on Fennoscandian salmon (*Salmo salar*) // Ann. Zool. Fennici. 2009. Vol. 46. P. 21–33.
- Landry C., Bernatchez L. Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Molecular Ecology. 2001. Vol. 10, N 10. P. 2525–2539.
- Langefors A., Lohm J., Grahn M., Andersen Q., Schantz T. Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon // Proc. R. Soc. Lond. 2001. Vol. 268. P. 479–485.
- Lewontin R., Krakauer J. Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms // Genetics. 1973. Vol. 74, N 1. P. 175–195.
- Malmberg G. Salmonid transports, culturing and *Gyrodactylus* infections in Scandinavia / Eds. Bauer O. E. Parasites of freshwater fishes of North-West Europe. Institute of Biology, USSR, Academy of Sciences, Karelian Branch, Petrozavodsk, 1989. P. 88–104.
- Moya-Laraco J. Can Temperature and Water Availability Contribute to the Maintenance of Latitudinal Diversity by Increasing the Rate of Biotic Interactions? // The Open Ecology Journal. 2010. Vol. 3. P. 1–13.
- Olafsdýttir G. A., Snorrason S. S., Ritchie M. G. Postglacial intra-lacustrine divergence of Icelandic threespine stickleback morphs in three neovolcanic lakes // Journal of Evolutionary Biology. 2007. Vol. 20. P. 1870–1881.
- Oleksyk T., Smith M., O'Brien S. Genome-wide scans for footprints of natural selection // Phil. Trans. R. Soc. B. 2010. Vol. 365. P. 185–205.
- Ozerov M. Y., Veselov A. J., Lumme J., Primmer C. R. Genetic structure of freshwater Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations from the lakes Onega and Ladoga of northwest Russia and implications for conservation // Conservation Genetics. 2010. Vol. 11. P. 1711–1724.
- Piertney S. B., Oliver M. K. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex // Heredity. 2006. Vol. 96. P. 7–21.
- Raymond M., Rousset F. GENEPOP [Version 1.2]: Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism // Heredity. 1995. Vol. 86, № 3. P. 248–249.
- Rogers A. D. Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2007. Vol. 362. P. 2191–2214.
- Schlötterer C. A microsatellite-based multilocus screen for the identification of local selective sweeps // Genetics. 2002. Vol. 160. P. 753–763.
- Slatkin M., Voelm L. F_{ST} in a Hierarchical Island Model // Genetics. 1991. Vol. 127. P. 627–629.
- Soleng A., Bakke T. Salinity tolerance of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea): laboratory studies // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1997. Vol. 54, N 8. P. 1837–1864.

Stet R. J., de Vries B., Mudde K., Hermsen T., van Heerwaarden J., Shum B. P., Grimholt U. Unique haplotypes of co-segregating major histocompatibility class II A and class II B alleles in Atlantic salmon (*Salmo salar*) give rise to diverse class II genotypes // Immunogenetics. 2002. Vol. 54, N 5. P. 320–331.

Tonteri A., Titov S., Veselov A. J., Zubchenko A., Koskinen M., Lesbarrères D., Kaluzchin S., Bakhmet I., Lumme J., Primmer C. R. Phylogeography of anadromous and non-anadromous Atlantic salmon (*Salmo salar*) from northern Europe // Ann. Zool. Fennici. 2005. Vol. 41. P. 1–22.

Tonteri A., Veselov A. J., Titov S., Lumme J., Primmer C. R. The effect of migratory behavior on genetic diversity and population divergence: a comparison of anadromous and freshwater Atlantic salmon *Salmo salar* // Journal of Fish Biology. 2007. Vol. 70. P. 381–398.

Tonteri A., Vasemägi A., Lumme J., Primmer C. R. Use of differential expression data for identification of

novel immune relevant expressed sequence tag-linked microsatellite markers in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Molecular Ecology Resources. 2008. Vol. 8. P. 1486–1490.

Tonteri A., Veselov A. J., Zubchenko A., Lumme J., Primmer C. R. Microsatellites reveal clear genetic boundaries among Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations from the Barents and White seas, northwest Russia // Canadian Journal of Fisheries And Aquatic Sciences. 2009. Vol. 66. P. 717–735.

Tonteri A., Vasemägi A., Lumme J., Primmer C. R. Beyond MHC: signals of elevated selection pressure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) immune-relevant loci // Molecular ecology. 2010. Vol. 10. P. 1365–294.

Vasemägi A., Nilsson J., Primmer C. R. Seventy-five EST-linked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellite markers and their cross-amplification in five salmonid species // Molecular Ecology Notes. 2005. Vol. 5. P. 282–288.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Зуева Ксения Юрьевна

аспирантка
Департамент биологии,
подразделение генетики и физиологии
Итайнен Питкакату, 4, 20700
Университет Турку,
Турку Финляндия
эл. почта: ksezue@utu.fi
тел.: +35823335808

Озеров Михаил Юрьевич

научный сотрудник., к. б. н.
Департамент биологии,
подразделение генетики и физиологии
Итайнен Питкакату, 4, 20700
Университет Турку,
Турку, Финляндия
эл. почта: mikoze@utu.fi
тел.: +358468121565

Веселов Алексей Елпидифорович

главный научный сотрудник, д. б. н., профессор
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия 185910
эл. почта: veselov@krc.karelia.ru
тел.: +79114093805

Приммер Крейг Роберт

профессор
Департамент биологии,
подразделение генетики и физиологии
Итайнен Питкакату 4, 20700
Университет Турку,
Турку, Финляндия
эл. почта: craig.primmer@utu.fi
тел.: +35823335571

Zueva, Ksenia

Department of Biology, Division of Genetics and Physiology
4 Itäinen Pitkätatu, 20700
University of Turku,
Turku Finland
e-mail: ksezue@utu.fi
tel.: +358 2 333 5808

Ozerov, Mikhail

Department of Biology, Division of Genetics and Physiology
4 Itäinen Pitkätatu, 20700
University of Turku,
Turku Finland
e-mail: mikoze@utu.fi
tel.: +358468121565

Veselov, Alexey

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk,
Karelia, Russia
e-mail: veselov@krc.karelia.ru
tel.: +358 2 333 5808

Primmer, Craig

Department of Biology, Division of Genetics and Physiology
4 Itäinen Pitkätatu, 20700
University of Turku,
Turku Finland
e-mail: craig.primmer@utu.fi
tel.: +358 2 333 5808