—— ГЕНЕТИКА ——

УДК 575.174.015.3:597.5

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НЕРКИ Oncorhynchus nerka Walbaum КАМЧАТКИ И КОМАНДОРСКИХ ОСТРОВОВ НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ДНК

© 2016 г. С. Д. Павлов^{*}, Е. В. Пономарева^{*}, М. В. Холодова^{**, ***}, М. Н. Мельникова^{*}, Т. В. Минеева^{*}

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический ф-т, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

**Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова, 119071 Москва, Ленинский просп., 33

*** Томский государственный университет, 634050 Томск, просп. Ленина, 36

E-mail: serge_pavlov@mail.ru Поступила в редакцию 22.07.2015 г.

Исследовано генетическое разнообразие жилой и проходной форм нерки Oncorhynchus nerka Walbaum у 14 популяций из различных водоемов Камчатки и Командорских о-вов по 10 локусам микросателлитной ДНК. Отмечены значительные отличия по частотам аллелей между популяциями кокани из оз. Кроноцкого, остаточной формой нерки из оз. Копылье и другими проанализированными популяциями. Установлено, что характер кластеризации выборок соответствует их географическому положению. Различий по частотам аллелей исследованных локусов между двумя формами жилой нерки из оз. Кроноцкого выявлено не было. У нерки с Командорских о-вов обнаружены относительно низкое генетическое разнообразие и наибольшая удаленность от остальной камчатской группы.

DOI: 10.7868/S0002332916010136

Нерка Oncorhynchus nerka Walbaum характеризуется амфипацифичным распространением и является важнейшим промысловым видом, изучение которого входит в основные "стратегические" задачи многих стран. В азиатской части ареала нерка представлена в основном нативными популяциями, исследование генофонда которых особенно важно для сохранения вида в целом. Известно, что вид O. nerka образует как проходные анадромные, так и жилые пресноводные формы (Берг, 1948; Бугаев 1995). В ряде случаев пресноводные формы могут быть потомками проходных рыб (обычно это самцы), которые не скатились в океан, но свободно скрещиваются с проходными самками. Таких особей в англоязычной литературе иногда называют "residual", т.е. "остаточные" (Ricker, 1959). Кроме того, пресноводные группировки нерки могут быть представлены самовоспроизводящимися обособленными изолятами, существующими на протяжении ряда поколений, – кокани (Jordan, Hubbs, 1925; Берг, 1948). Весь жизненный цикл кокани протекает в пресных озерах. Как правило, озера, в которых существуют кокани, не имеют связи с океаном или возможности возврата покатников в озеро (физические преграды). Одна из крупнейших популяций кокани азиатской части ареала локализуется в оз. Кроноцком (юго-восток Камчатки). Обитающая в нем кокани образует две формы по

типу питания — планктофаги и бентофаги, различающиеся по ряду меристических признаков, морфологии (Куренков, 1979). Предполагается, что эти две формы репродуктивно изолированы (Куренков, 1977, 1979; Маркевич, Салтыкова, 2012), однако до настоящего момента этот факт не был подтвержден методами молекулярно-генетического анализа.

В последние годы для изучения структуры популяций и идентификации стад нерки широкое распространение получили различные молекулярно-генетические методы, в частности анализ микросателлитной ДНК (Алтухов и др., 1997; Варнавская, 2006; Хрусталева, 2007 и др.). Несмотря на то что генетическая дифференциация нерки по маркерам микросателлитной ДНК достаточно хорошо изучена на большей части видового ареала, внутри отдельных труднодоступных локальностей генетическое разнообразие продолжает оставаться неисследованным или слабоизученным. К таким генетически малоисследованным популяциям нерки относятся жилая форма (кокани) из оз. Кроноцкого, "остаточная" форма из оз. Копылье, проходные популяции с Командорских о-вов.

Основная задача исследования — изучение генетического разнообразия по маркерам ядерной ДНК у малоисследованных популяций различных

№ выборки	Обозначение выборки	Форма	Локальность	Регион	N^*
1	Коп	Остаточная	оз. Копылье	Зап. Камчатка	62
2	Кол	Проходная	р. Коль	»	41
3	Кур	»	оз. Курильское	»	52
4	Аза	»	оз. Азабачье	Вост. Камчатка	30
5	Нач	»	оз. Начикинское	Зап. Камчатка	50
6	KpP	»	р. Кроноцкая	Вост. Камчатка	42
7	Тол	Жилая	оз. Толмачева	Зап. Камчатка	40
8	КрО	»	оз. Кроноцкое	Вост. Камчатка	28
9	Узо	»	р. Узон	»	43
10	Ала	»	руч. Аланд	»	35
11	Кон	»	о-в Конради	»	46
12	Гав	Проходная	р. Гаванская	Командорские о-ва, о-в Беринга	29
13	Cap	»	оз. Саранное	»	48
14	Жир	»	оз. Жировое	Командорские о-ва, о-в Медный	43

Таблица 1. Обозначение и локализация исследованных выборок

* *N* – объем выборки, экз.

форм нерки с Камчатки и Командорских о-вов, их отношений между собой и с другими популяциями вида в азиатской части ареала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было проанализировано 589 особей нерки из 14 выборок по 10 микросателлитным локусам. Обозначения и краткая характеристика выборок представлены в табл. 1, их локализация показана на рис. 1. Для проведения популяционно-генетического анализа были выбраны локусы микросателлитной ДНК, широко используемые в подобных исследованиях лососевых рыб: One102, One105, One109, One112, One115 (Olsen et al., 2000), OMM1037, OMM1070 (Rexroad et al., 2001), Ots100, Ots107, Ots253 (Nelson, Beachem, 1999). Локус Ots100 определяется динуклеотидными повторами, все остальные локусы – тетрануклеотидными.

Для генетического анализа использовались кусочки плавников, фиксированных спиртом. Плавники до выделения хранились в 96%-ном спирте в морозильнике. ДНК из плавников выделяли с использованием набора QIAGEN DNeasyTM (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя. Экстрагированная ДНК хранилась при -20°С. Прямые праймеры синтезировались с флуоресцентной меткой с использованием четырех красителей (ROX, TAMRA, FAM, R6G). Амплификацию проводили в 10 мкл смеси, содержавшей 10ХТад-буфер, 2 мМ Mg²⁺, 2.5 мМ dNTP's, 0.5 U Тад-полимеразы (Диалат, Россия), 0.5 пкМ каждого праймера, 1.5 мкл ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере Tetrad 2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) в следующем режиме: $I - 94^{\circ}C - 4$ мин, затем 30 циклов II -94°С – 15 с, *T_a* – 20 с, 72°С – 20 с, заключительная элонгация 72°С – 10 мин. Для праймеров температура отжига $T_a = 56 - 62^{\circ}$ С (в зависимости от локуса). Перед постановкой на электрофорез разведенные (приблизительно в 120 раз) амплификаты денатурировали с формамидом, в каждую пробу добавлялся стандарт GeneScan[™] 500 LIZ®. Капиллярный гель-электрофорез проводился в генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosvstems, США). Длины аллелей определяли в программе GeneMarker V.1.2 (SoftGenetics LLC).

Статистический анализ. Отклонение от равновесия Харди–Вайнберга, неравновесие локусов по сцеплению и попарную дифференциацию выборок рассчитывали в программе GENEPOP V.4.1 (Raymond, Rousset, 1995). В этой же программе рассчитывалась попарная дифференциация выборок на основе точного критерия Фишера. В программе Arlequin V.3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005) вычислялась матрица попарных F_{ST} и статистическая достоверность этих значений. В этой же программе анализировались иерархическая структура выборок на основе молекулярной из-



Рис. 1. Локализация исследованных выборок нерки. Озера Начикинское (выборка 5) и Толмачева (выборка 7) находятся в восточной части Камчатки, но их сток приурочен к западному побережью. Нумерация выборок соответствует таковой в табл. 1; для рис. 1, 2, 4–6.

2016

менчивости AMOVA (Analysis of molecular variance) и выявлялись локусы, находящиеся под отбором. Аллельное и генетическое разнообразие в выборках рассчитывали в программе FSTAT 2.9.3. (Goudet, 1995). Отображение матрицы попарных значений F_{ST} проводили в программе STATISTI-КА 6.0 (StatSoft), а для снижения размерности матрицы использовали метод многомерного шкалирования. Чтобы определить кластерные группы выборок, мультилокусные генотипы были проанализированы на основе алгоритма Гиббса в программе STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Четыре повторности были заданы для определения значения К (числа кластеров). Значения К были заданы от 1 до 14; 500000 итераций по методу Монте-Карло для марковских цепей (МКМЦ) после 400 000 испытаний на отказ; в анализе использовалась смешанная модель с корреляцией аллелей. Анализ числа кластеров проводился в онлайн-программе STRUCTURE HARVESTER (Earl, von Holdt, 2012) методом

Эванно с соавт. (Evanno *et al.*, 2005) с расчетом ΔK (ΔK = Mean|Ln*P*"(*K*)|/StdevLn*P*(*K*), где Mean – среднее, Stdev – стандартное отклонение, *P*(*K*) – апостериорная вероятность числа кластеров). Наибольшее значение ΔK соответствует наиболее вероятному числу кластеров. Последующие раунды кластеризации проводились по той же схеме, менялось только задаваемое число кластеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отклонения от равновесия Харди-Вайнберга с дефицитом гетерозигот наблюдались в выборках из руч. Аланд и озер Курильского, Азабачье по локусу *Ots253*, из оз. Толмачева по локусам *One115*, *Ots100* (табл. 2). После внесения поправки Бонферрони для множественных тестов (Rice, 1989) отклонений от равновесия Харди-Вайнберга выявлено не было. Ни в одной из выборок не наблюдалось неравновесие по сцеплению ло-

2	0

Таблица 2. Генетические характеристики исследованных выборок нерки по локусам

Локус	Коп	Кол	Кур	Аза	Нач	KpP	Тол	KpO	Узо	Ала	Кон	Гав	Cap	Жир	По локу- сам
One 105															
$\begin{array}{c} A \\ A_R \\ H_E \\ H_O \end{array}$	3	6	6	4	8	7	4	5	4	6	5	4	3	5	8
	2.91	5.27	5.29	3.93	7.27	6.52	3.99	5	3.97	5.79	4.57	3.97	2.58	4.3	5.47
	0.375	0.488	0.612	0.245	0.592	0.596	0.527	0.712	0.595	0.625	0.672	0.605	0.486	0.375	0.633
	0.307	0.415	0.635	0.267	0.62	0.571	0.475	0.67	0.429	0.714	0.711	0.655	0.583	0.581	0.535
One112		10	10		•	•		10			•			10	~ .
$A \\ A_R \\ H_E \\ H_O \\ OMM1070$	16	18	19	17	20	20	16	19	22	16	20	21	17	19	31
	13.94	15.19	15.03	16.5	15.9	17.5	14.95	19	18.8	14.91	18.88	20.65	14.60	13.94	19.41
	0.887	0.839	0.856	0.889	0.824	0.902	0.906	0.952	0.923	0.904	0.944	0.832	0.824	0.887	0.922
	0.887	0.854	0.846	0.933	0.78	0.81	0.944	0.964	0.93	0.971	0.933	0.897	0.833	0.861	0.882
$A \\ A_R \\ H_E \\ H_O \\ Ots 100$	12	17	22	18	13	18	9	12	10	8	13	7	11	7	35
	10.51	14.64	17.87	17.59	11.1	15.54	8.71	12	9.51	7.59	11.9	6.93	9.75	10.51	13.24
	0.854	0.905	0.920	0.903	0.837	0.888	0.78	0.901	0.869	0.753	0.869	0.808	0.847	0.77	0.886
	0.952	0.902	0.827	0.9	0.9	0.833	0.763	0.821	0.861	0.743	0.8	0.724	0.854	0.721	0.836
$A \\ A_R \\ H_E \\ H_O \\ Ots 107$	11	12	11	9	10	15	7	10	8	6	15	6	7	8	19
	8.92	10.9	10.07	8.93	9.33	13.48	6.34	10	7.49	5.76	11.88	5.9	5.71	6.91	10.82
	0.782	0.845	0.86	0.872	0.82	0.891	0.657	0.793	0.718	0.681	0.789	0.257	0.35	0.384	0.83
	0.871	0.8	0.827	0.8	0.878	0.928	0.59*	0.694	0.762	0.714	0.8	0.241	0.375	0.349	0.703
$A \\ A_R \\ H_E \\ H_O \\ Orac 100$	2	3	3	4	4	5	3	3	4	3	4	3	3	2	8
	2	2.68	2.99	3.99	3.11	4.00	2.91	3	3.53	3	3.48	2.93	2.83	2	3.5
	0.176	0.201	0.26	0.551	0.134	0.238	0.186	0.199	0.362	0.673	0.223	0.068	0.157	0.068	0.269
	0.194	0.177	0.231	0.467	0.1	0.262	0.2	0.143	0.372	0.771	0.244	0.069	0.125	0.07	0.235
$A \\ A_R \\ H_E \\ H_0 \\ Cr 252$	10	13	12	11	11	14	7	12	11	8	11	9	9	10	15
	8.19	12.26	11.32	10.80	10.16	12.81	6.43	12	10.64	7.2	10.24	8.99	8.75	8.19	11.2
	0.72	0.887	0.863	0.870	0.858	0.901	0.568	0.837	0.89	0.634	0.85	0.883	0.857	0.848	0.86
	0.694	0.854	0.904	0.767	0.9	0.81	0.564	0.857	0.861	0.543	0.804	0.862	0.813	0.837	0.793
$ \begin{array}{c} A \\ A_R \\ H_E \\ H_O \\ OMM1037 \end{array} $	9	11	9	9	9	9	8	11	10	8	11	6	6	7	17
	8.34	9.94	7.57	8.86	8.6	8.54	7.86	11	9.17	7.75	10.01	5.93	5.57	6.29	9.52
	0.794	0.837	0.786	0.784	0.842	0.842	0.771	0.835	0.808	0.761	0.832	0.73	0.706	0.684	0.821
	0.697	0.707	0.654*	0.667*	0.78	0.762	0.725	0.75	0.791	0.543*	0.756	0.759	0.646	0.651	0.704
$A \\ A_R \\ H_E \\ H_O \\ One 115$	3	3	4	3	2	3	2	2	3	2	3	2	2	3	4
	3	2.9	3.96	2.99	2	2.97	2	2	2.99	2	2.98	2	2	2.96	3.04
	0.444	0.531	0.580	0.461	0.489	0.497	0.499	0.299	0.393	0.401	0.404	0.267	0.357	0.413	0.458
	0.468	0.463	0.615	0.367	0.420	0.405	0.550	0.286	0.326	0.429	0.378	0.241	0.375	0.395	0.427
$A \\ A_R \\ H_E \\ H_O \\ One 102$	11	15	13	15	11	12	14	15	14	9	15	10	12	9	19
	10.07	14.63	11.82	14.86	9.81	11.07	13.27	15	13.06	8.59	13.99	9.97	10.99	8.4	13.47
	0.762	0.922	0.889	0.932	0.842	0.881	0.889	0.911	0.905	0.748	0.926	0.857	0.857	0.762	0.909
	0.758	0.976	0.846	0.967	0.78	0.846	0.775*	0.964	0.907	0.765	0.957	0.724	0.875	0.721	0.843
A A_R H_E H_O По вы-	11 8.26 0.749 0.71	10 9.48 0.829 0.951	11 9.26 0.818 0.827	10 9.99 0.881 0.767	10 9.18 0.83 0.796	11 10.24 0.834 0.725	8 7.58 0.701 0.625	11 11 0.855 0.821	11 9.91 0.841 0.883	8 7.64 0.798 0.765	11 10.28 0.853 0.913	10 9.89 0.811 0.793	9 8.86 0.852 0.896	7 6.84 0.769 0.814	14 10.44 0.853 0.807
боркам A	8.8	10.8	11	10	9.8	11.4	7.8	10	9.7	7.4	10.8	7.8	7.9	7.7	
A_R	7.61	9.79	9.52	9.84	8.65	10.27	7.4	10	8.91	7.02	9.82	7.72	7.16	7.03	
H_E	0.654	0.728	0.744	0.738	0.707	0.746	0.648	0.729	0.73	0.698	0.736	0.612	0.629	0.623	
H_O	0.652	0.709	0.721	0.69	0.695	0.695	0.631	0.682	0.712	0.696	0.73	0.597	0.638	0.6	

Примечание. A – аллельное разнообразие, A_R – то же, рассчитанное по минимальной выборке (28 экз.), H_E – ожидаемая гетерозиготность, H_O – наблюдаемая гетерозиготность.

* Выделены значения, отклоняющиеся от равновесия Харди-Вайнберга.

№ вы- борки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
2	0.071		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
3	0.072	0.013		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
4	0.067	0.026	0.026		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
5	0.083	0.022	0.029	0.047		***	***	***	***	***	***	***	***	***
6	0.061	0.012	0.012	0.026	0.012		***	***	***	***	***	***	***	***
7	0.108	0.054	0.057	0.077	0.055	0.052		***	***	***	***	***	***	***
8	0.077	0.042	0.034	0.051	0.03	0.022	0.035		ns	***	ns	***	***	***
9	0.079	0.043	0.033	0.044	0.036	0.023	0.044	0.002		***	**	***	***	***
10	0.177	0.13	0.113	0.129	0.121	0.112	0.112	0.065	0.082		***	***	***	***
11	0.078	0.041	0.035	0.049	0.036	0.021	0.037	0.004	0.011	0.085		***	***	***
12	0.128	0.102	0.09	0.117	0.072	0.077	0.132	0.081	0.073	0.16	0.08		*	***
13	0.14	0.102	0.091	0.117	0.081	0.084	0.141	0.091	0.083	0.157	0.093	0.008		***
14	0.147	0.1	0.087	0.123	0.075	0.083	0.131	0.084	0.076	0.147	0.086	0.013	0.019	

Таблица 3. Матрица попарных значений F_{ST} и значимость тестов

Примечание. Номера выборок соответствуют таковым в табл. 1. Под диагональю — матрица попарных значений F_{ST} . Градиент серого цвета соответствует значения $F_{ST} = 0 - 0.2$, более темный цвет — более высокие значения F_{ST} . Над диагональю — значимость тестов: *** — P < 0.001, ** — P < 0.01, * — P < 0.05, пѕ — не значимо.

2016

кусов после внесения поправки для множественных тестов.

Генетическое разнообразие. Основные характеристики нерки по локусам и выборкам представлены в табл. 2. По всей совокупности 10 исследованных локусов было выявлено 168 аллелей (табл. 2). Наименьшее их число было обнаружено в локусе *ОММ1037* (4 аллеля), наибольшее — в локусе *ОММ1070* (35 аллелей). Аллельное разнообразие в выборках было рассчитано по минимальной выборке (28 экз., оз. Кроноцкое) и изменялось от 1.96 до 19 (табл. 2). Генетическое разнообразие варыровало от наименьшего значения в озерах Жировом и Саранном (Командорские о-ва) по локусу *Ots107* (0.068) до наибольшего в р. Узон (оз. Кроноцкое) по локусу *One112* (0.952) (табл. 2).

Генетическая дифференциация исследованных выборок нерки. Высокозначимая генетическая дифференциация (P < 0.001) наблюдалась между большинством выборок, за исключением выборки из оз. Кроноцкого (смешанная, нагульная) и выборок из р. Узон и района о-ва Конради (обе выборки из оз. Кроноцкого), а также между выборками из р. Гаванской и оз. Саранного (обе выборки с о-ва Беринга, P < 0.05). Среднее значение $F_{\rm ST}$ составило 0.078. Степень попарной дифференциации выборок на рассчитанных значениях $F_{\rm ST}$ ранжировалась от 0.002 до 0.177 (табл. 3).

Многомерное шкалирование на основе матрицы попарных дистанций F_{ST} (табл. 3) представлено на рис. 2. В результате анализа выявлены три значимые оси и рассчитаны соответствующие

значения $F_{\rm ST}$, описывающие наибольшие различия по осям: 0.026, 0.017, 0.01. По первой оси, характеризующей наибольшее разнообразие, отделялись выборки Командорских о-вов, по второй — выборки проходных популяций из рек Камчатки



Рис. 2. График многомерного шкалирования в пространстве трех главных измерений.



Рис. 3. Графическое отображение определения числа кластеров.

и оз. Кроноцкого, по третьей — выборка из оз. Копылье и руч. Аланд.

В результате проведенного анализа в программе STRUCTURE 2.3.4 наибольшее значение ΔK соответствовало четырем кластерам (рис. 3). В отдельный кластер выделилась выборка из оз. Копылье, определился кластер проходных популяций нерки с Камчатки, кластер выборок из озер Кроноцкого и Толмачева и кластер выборок с Командорских о-вов (рис. 4).

Среди проходных популяций после первого раунда кластеризации в отдельный кластер дифференцируется выборка из оз. Копылье (Западная Камчатка). Дальнейшая дифференциация проходных выборок в программе STRUCTURE 2.3.4 по методу Эванно с соавт. (Evanno et al., 2005) выделяет два кластера. В результате выборка из оз. Начикинского (Западная Камчатка) определяется в отдельный кластер (рис. 5). Каждый последующий раунд кластеризации выделяет одну выборку, не образуя кластерных групп. Подобный полход с использованием иерархической кластеризации для выявления подразделенности внутри крупных кластеров широко используется в популяционной генетике рыб, включая лососевые виды (Vähä et al., 2007; Zhivotovsky et al., 2014; Semenova et al., 2015 и др.).

В целом деление по пяти кластерам группы проходных популяций отражает самостоятель-

ность каждой из пяти анализируемых выборок (рис. 6). По результатам межпопуляционной дифференциации выборки из этих водоемов с высокой степенью достоверности ($P \ll 0.001$) отличаются одна от другой, объединения выборок в группы внутри проходного кластера не наблюдается.

На основе полученной в программе STRUC-TURE 2.3.4 кластеризации был проведен иерархический анализ (AMOVA) в программе Arlequin V.3.5.1.3. Были выделены следующие группы: 1 – из оз. Копылье, прелставленная олной выборкой: 2 – группа проходных популяций с Камчатки, включающая в себя выборки из рек Кроноцкой и Коль, озер Азабачье, Курильского; 3 – группа из оз. Кроноцкого, включающая в себя выборки кокани из р. Узон, руч. Аланд, впадающих в оз. Кроноцкое, и озерных выборок: смешанной нагульной (из озера) и нерестовой (из района о-ва Конради) и выборку из оз. Толмачева; 4 – группа, объединяющая выборки проходных популяций Командорских о-вов из оз. Саранного, р. Гаванской и оз. Жирового.

В результате иерархического анализа на изменчивость между группами приходится 5.5% (P < 0.001), на межвыборочную -2.9% (P < 0.001), на внутривыборочную – 91.6% (*P* < 0.001). Наибольший вклад в межгрупповую изменчивость вносят локусы Ots100 (18.1%) и One105 (10.1%). Эти же локусы находятся под действием отбора. Кроме двух упомянутых выше локусов под действием отбора находится локус ОММ1070. В межпопуляционную изменчивость наибольший вклад вносит локус Ots107, во внутрипопуляционную – Ots253. Для выделенных групп (выборка из оз. Копылье была исключена из этого анализа) были рассчитаны основные характеристики генетического и аллельного разнообразия (табл. 4).

Наименьшим разнообразием обладали выборки с Командорских о-вов, в других группах основные параметры были близки, наиболее высокое аллельное разнообразие было в группе проходных камчатских популяций (табл. 4).

Таким образом, все исследованные выборки нерки с наибольшей долей вероятности делятся на четыре кластера, соответствующих их геогра-



Рис. 4. Кластеризация выборок на основе алгоритма программы STRUCTURE 2.3.4. Разные оттенки серого соответствуют четырем кластерам и отображают вероятность (значения вероятности указаны слева) принадлежности к ним особей.



Рис. 5. 2-й раунд дифференциации группы проходных в программе STRUCTURE 2.3.4 (*K* = 2). Разные оттенки серого соответствуют двум кластерам и отображают вероятность (значения вероятности указаны слева) принадлежности к ним особей.



Рис. 6. Кластеризация выборок проходных популяций без выборки из оз. Копылье (*K* = 5). Разные оттенки серого соответствуют пяти кластерам и отображают вероятность (ее значения указаны слева) принадлежности к ним особей.

фическим локальностям (рис. 4). Наиболее удаленный кластер состоит из выборок с Командорских о-вов, обладает наименьшим генетическим разнообразием, что может объясняться относительной обедненностью генома у многих островных популяций. В отдельный кластер выделяется проходная популяция из оз. Копылье. Популяции. включающие в себя жилые формы из озер Кроноцкого и Толмачева, также образуют отдельный кластер. Остальные популяции с Камчатки проходные и образуют общий кластер с наибольшим аллельным разнообразием. Важно отметить, что выборка проходной нерки из нижнего течения р. Кроноцкой, вытекающей из оз. Кроноцкого, также объединяется в кластер с проходными камчатскими популяциями, а не с выборками жилых форм (кокани) из оз. Кроноцкого.

На основе AMOVA-анализа подтверждается наличие иерархической структуры исследованных выборок нерки — различия между группами почти в 2 раза выше различий между выборками внутри групп. Кроме того, результаты этого анализа (локусы, вносящие наибольший вклад в межгрупповую и межпопуляционную изменчивости) могут быть учтены в дискриминационном анализе морских стад нерки. Генетические особенности популяций нерки из разных локальностей. В выборках из оз. Кроноцкого, где обитает только жилая форма, средние значения гетерозиготности не отличались от таковых в группе проходных популяций и по некоторым локусам были наибольшими среди всех исследованных выборок (табл. 2). Дифференциация выборок из оз. Кроноцкого показала заметное отличие нерки из руч. Аланд – одного из небольших

Таблица 4. Основные генетические характеристики для выделенных групп популяций

Генетицеская	Группы популяций								
характери- стика	проходные популяции Камчатки	оз. Кроноц- кое-оз. Тол- мачево	Командор- ские о-ва						
A_R	9.28	8.63	7.33						
H_O	0.692	0.692	0.614						
H_S	0.715	0.709	0.623						
F_{ST}	0.042	0.048	0.014						

Примечание. A_R – аллельное разнообразие, H_O – наблюдаемая гетерозиготность, H_S – гетерозиготность в выборках, F_{ST} – внутригрупповой коэффициент инбридинга.



Рис. 7. Кластеризация кокани из оз. Кроноцкого по типу питания. Разные оттенки серого соответствуют двум кластерам и отображают вероятность (ее значения указаны слева) принадлежности к ним особей. *1* – бентофаги, *2* – планктофаги.

притоков озера, ничем особо не отличающегося от других. При этом по результатам многомерного шкалирования (кластеризации с использованием алгоритма программы STRUCTURE 2.3.4) эта выборка объединяется в общий кластер с другими выборками из оз. Кроноцкого (рис. 2, 4). Выборка из крупного озерного притока – р. Узон – и нерестовая выборка около озерного о-ва Конради отличались одна от другой с низкой степенью достоверности (P < 0.05) и не отличались от нагульной выборки из оз. Кроноцкого.

Выборка из р. Узон была представлена двумя формами кокани (бентофагами и планктофагами), как и нагульная выборка, пойманная непосредственно в озере. Отсутствие достоверных различий позволило объединить эти выборки и оцедостоверность генетических различий нить между трофическими группами жилой нерки. Общая численность объединенной выборки составила 71 особь (37 бентофагов и 34 планктофага). Анализ жилых выборок из оз. Кроноцкого по типу питания деления на кластеры не выявил (рис. 7), что может указывать на отсутствие репродуктивной изоляции между трофическими формами нерки в оз. Кроноцком. Это необходимо проверить на более широком ряде генетических маркеров в дальнейших исследованиях.

Таким образом, выбранные локусы позволяют идентифицировать лишь жилые и проходные популяции нерки из оз. Кроноцкого. Популяция кокани в озере оказалась изолированной 10-12 тыс. лет назад (Куренков, 1979). Большинство исследователей отмечают снижение генетического и аллельного разнообразия в жилых популяциях по сравнению с проходными популяциями (Beacham et al., 2006; Yamamoto et al., 2011 и др.), но у исследованных выборок кокани из оз. Кроноцкого значения этих показателей такие же высокие, как у проходных популяций, а по отдельным локусам даже выше (табл. 2). Возможно, это связано с тем, что, как и вся ихтиофауна озера, популяции кокани оказались изолированными от проходной нерки достаточно давно, а озерноречная система Кроноцкая – одна из крупнейших на п-ове Камчатка – позволила сохранить высокую численность и разнообразие жилых изолятов нерки.

В 1980-х гг. в оз. Толмачева была интродуцирована кокани из оз. Кроноцкого (Куренков, 1999). В настоящее время в оз. Толмачева происходит успешное формирование популяции с изменением морфобиологических показателей, отличаюших ее от донорской популяции (Маркевич, 2008, 2009). Однако при изучении генетических особенностей видно, что спустя несколько десятилетий нерка из оз. Толмачева по-прежнему объединяется в один кластер с популяциями из оз. Кроноцкого вследствие своего происхождения. При этом отмечено снижение аллельного и генетического разнообразия толмачевской нерки относительно кроноцкой (табл. 2), характерное для большинства интродуцированных популяций рыб, по сравнению с родительскими (Sønstebø et al., 2008). Такое явление хорошо объясняется временем и особенностями интродукции кроноцких популяций вида в данное озеро (Куренков, 1979), при этом снижение генетического разнообразия часто характеризует успешную адаптацию вселенной популяции (Gordeeva, Salmenkova, 2011).

Значительные отличия по частотам микросателлитных локусов нерки из оз. Копылье от нерки всех других выборок могут быть связаны с наличием отбора по данным локусам у "остаточной" формы нерки, обитающей в озере, и отражать интенсивные процессы отбора, протекающие в озере.

Относительно низкое генетическое разнообразие по микросателлитным локусам островных популяций проходной нерки из озерно-речных систем Командорских о-вов можно объяснить исходно низкой численностью командорских популяций и их изолированностью. При этом по недавно полученным неопубликованным данным исследований митохондриальной ДНК (Минеева, 2015) командорские популяции уверенно относятся к северной (камчатской) филогеографической группе нерки.

Авторы благодарят Г.Н. Маркевича, сотрудников кафедры ихтиологии МГУ, ФГБУ "Кроноцкий государственный заповедник" и ФГБУ Государственный природный биосферный заповедник "Командорский" им. С.В. Маракова.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 11-04-02056-а, 14-04-01437-а, 15-29-02448офи_м), РГНФ (грант №14-06-00726), программой "Ведущие научные школы" (грант НШ-2666.2014.4), а также программой фундаментальных исследований Президиума РАН "Биоразнообразие природных систем" (подпрограмма "Генофонды живой природы и их сохранение") и РНФ (грант № 14-50-00029; частичная обработка материала).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 287 с.
- *Берг Л.С.* Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Ч. 1. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1948. 468 с.
- *Бугаев В.Ф.* Азиатская нерка (пресноводный период жизни, структура локальных стад, динамика численности). М.: Колос, 1995. 464 с.
- Варнавская Н.В. Генетическая дифференциация популяций тихоокеанских лососей. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 2006. 488 с.
- Куренков С.И. Две репродуктивно изолированные группы жилой нерки *Oncorhynchus nerka* Кроноцкого озера // Вопр. ихтиологии. 1977. Т. 17. Вып. 4 (105). С. 597–606.
- Куренков С.И. Популяционная структура кокани Кроноцкого озера: Дис. канд. биол. наук. М.: МГУ, 1979. 250 с.
- Куренков С.И. Результаты интродукции кокани в озера Камчатки // Тез. докл. обл. науч.-практ. конф. "Проблемы охраны и рационального использования биоресурсов Камчатки". Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс, 1999. С. 30–39.
- Маркевич Г.Н. Возрастная структура и рост жилой нерки – кокани Oncorhynchus nerka естественной и интродуцированных популяций в озерах Камчатки // Вопр. ихтиологии. 2008. Т. 48. № 4. С. 494–500.
- Маркевич Г.Н. Результаты интродукции жилой формы нерки Oncorhynchus nerka в Толмчевское озеро (Камчатка) // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49. № 1. С. 85–92.
- Маркевич Г.Н., Салтыкова Е.А. Пространственная дифференциация кокани в бассейне оз. Кроноцкое // Тр. Кроноцкого гос. природ. биосфер. заповедника. Вып. 2. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс, 2012. С. 175–182.
- *Хрусталева А.М.* Комплексный метод дифференциации нерки (*Oncorhynchus nerka*) азиатских стад. М.: Изд-во ВНИРО, 2007. 165 с.
- Beacham T.D., McIntosh B., MacConnachie C., Miller K.M., Withler R.E., Varnavskaya N. Pacific rim population structure of sockeye salmon as determined from micro-

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ № 1

satellite analysis // Trans. Am. Fish. Soc. 2006. V. 135. P. 174–187.

- *Earl D.A., von Holdt B.M.* STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conserv. Genet. Res. 2012. V. 4 (2) P. 359–361.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUC-TURE: a simulation study // Mol. Ecol. 2005. V. 14. P. 2611–2620.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinform. Online. 2005. V. 1. P. 47– 50.
- *Gordeeva N.V., Salmenkova E.A.* Experimental microevolution: transplantation of pink salmon into the European North // Evol. Ecol. 2011. V. 25 (3). P. 657–679.
- *Goudet J. FSTAT* (Vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics // J. Hered. 1995. V. 86. P. 485–486.
- Jordan D.S., Hubbs C.L. Record of fishes obtained by David Starr Jordan in Japan, 1922 // Mem. Carnegie Mus. 1925. V. 10. № 2. P. 93–346.
- Nelson R.J., Beachem T.D. Isolation and cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon // Anim. Genet. 1999. V. 30 (3). P. 228– 229.
- Olsen J.B., Wilson S.L., Kretschmer E.J., Jones K.C., Seeb J.E. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon // Mol. Ecol. 2000. V. 9 (12). P. 2185–2187.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. P. 945–959.
- Raymond M., Rousset F. GENEPOP (vers.-1.2) population-genetics software for exact tests and ecumenicism // J. Hered. 1995. V. 86. P. 248–249.
- Rexroad C.E. III, Coleman R.L., Martin A.M., Hershberger W.K., Killefer J. Thirty five polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) // Anim. Genet. 2001. V. 32 (5). P. 317–319.
- *Rice W.R.* Analazing tables of statistical tests // Evolution. 1989. V. 43. P. 223–225.
- *Ricker W.E.* Additional observation concerning residual sockeye and kokanee (*Oncorphynchus nerka*) // J. Fish. Res. Board Can. 1959. V. 16. № 6. P. 897–902.
- Semenova A., Stroganov A., Afanasiev K., Rubtsova G. Population structure and variability of pacific herring (*Clupea pallasii*) in the White Sea, Barents and Kara seas revealed by microsatellite DNA analyses // Polar Biol. 2015. V. 38. № 7. P. 951–965.
- Sønstebø J.H., Borgstrøm R., Heun M. High genetic introgression in alpine brown trout (Salmo trutta L.) populations from Hardangervidda, Norway // Ecol. Fresh. Fish. 2008. V. 17. P. 174–183.
- Vähä J.-P., Erkinaro J., Niemelä E., Primmer C.R. Life-history and habitat features influence the within-river genetic structure of Atlantic salmon // Mol. Ecol. 2007. V. 16. P. 2638–2654.

2016

- Yamamoto S., Kitamura S., Sakano H., Morita K. Genetic structure and diversity of Japanese kokanee Oncorhynchus nerka stocks as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA markers // J. Fish Biol. 2011. V. 79. P. 1340–1349.
- Zhivotovsky L.A., Yurchenko A.A., Nikitin V.D., Safronov S.N., Shitova M.V., Zolotukhin S.F., Makeev S.S., Weiss S., Rand P.S., Semenchenko A.Yu. Eco-geographic units, population hierarchy, and a two-level conservation strategy with reference to a critically endangered salmonid, Sakhalin taimen Parahucho perryi // Conserv. Gen. 2014. V. 16. Iss. 2. P. 431–441.

Genetic Diversity of Sock-Eyed Salmon *Oncorhynchus nerka* Walbaum of Kamchatka and the Commander Islands Based on Analysis of the Variability of Microsatellite DNA

S. D. Pavlov^{*a*}, E. V. Ponomareva^{*a*}, M. V. Kholodova^{*b*, *c*}, M. N. Melnikova^{*a*}, and T. V. Mineeva^{*a*}

^a Moscow State University, Department of Biology, Moscow, 119234 Russia

^b Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii prospect 33, Moscow, 119071 Russia

^c Tomsk State University, prospect Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

e-mail: serge_pavlov@mail.ru

The genetic diversity of the resident and migratory forms of sock-eyed salmon is investigated in 14 populations from various water bodies of Kamchatka and the Commander Islands by ten loci of microsatellite DNA. There are considerable differences in the frequencies of alleles among the populations of kokanee from Lake Kronotskoe, the residual form of sock-eyed salmon from Lake Kopylie, and other populations analyzed. Clustering of samples corresponds to their geographic position. No differences in the frequencies of alleles of the investigated loci are found between two forms of resident sock-eyed salmon from Kronotskoe Lake. In the sock-eyed salmon from the Commander Islands, a relatively low genetic diversity is found, as well as the greatest remoteness from the other Kamchatka group.