

ВОДНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ РОССИИ: СОСТОЯНИЕ, МОНИТОРИНГ, УПРАВЛЕНИЕ

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ
Всероссийской научной конференции с международным
участием, посвященной 85-летию
Камчатского научно-исследовательского института
рыбного хозяйства и океанографии
(3–6 октября 2017 г., Петропавловск-Камчатский)



УДК 575.857: 597.552.51

ВНУТРИВИДОВОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФИЛОГЕОГРАФИЯ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕЙ РОДА *ONCORHYNCHUS*

Д.А. Зеленина, В.А. Сошнина, Т.М. Минеева, Д.С. Стоклицкая

Вед. н. с., к. б. н.; мл. н. с.; мл. н. с.; мл. н. с.; Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии
107140, Москва, Верхняя Красносельская, 17
Тел., факс: (499) 264-85-19. E-mail: zelenina@vniro.ru

ТИХООКЕАНСКИЕ ЛОСОСИ, ONCORHYNCHUS, ФИЛОГЕОГРАФИЯ, МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ, ГАПЛОТИП

Наши филогенетические и филогеографические построения основаны на сравнительном анализе последовательности гена цитохрома b у более чем четырех тысяч особей, относящихся к пяти видам рода *Oncorhynchus* (горбуше, кете, нерке, кижучу и чавыче). Уровень внутривидового митохондриального полиморфизма значительно отличался у разных видов. Различная топология гаплогруппных сетей и неодинаковое распространение гаплогрупп на ареале свидетельствуют в пользу не только разной эволюционной истории видов, но и разных путей и направлений расселения тихоокеанских лососей в пределах современного ареала.

INTRASPECIFIC MITOCHONDRIAL POLYMORPHISM AND COMPARATIVE PHYLOGEOGRAPHY OF PACIFIC SALMON (GENUS *ONCORHYNCHUS*)

D.A. Zelenina, V.A. Soshnina, T.V. Mineeva, D.S. Stoklitskaya

Leading scientist, Ph. D. (Biology); Researcher; Researcher; Researcher; Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography
107140, Moscow, Verkhnyaya Krasnoselskaya, 17
Tel., fax: (499) 264-85-19. E-mail: zelenina@vniro.ru

PACIFIC SALMON, ONCORHYNCHUS, PHYLOGEOGRAPHY, MITOCHONDRIAL POLYMORPHISM, HAPLOTYPE

Our phylogenetic and phylogeographical constructs are based on a comparative analysis of the CytB gene sequences of more than four thousand individuals belonging to five species of the genus *Oncorhynchus* (pink salmon, chum salmon, sockeye salmon, coho salmon and chinook). The level of intraspecific mitochondrial polymorphism varied significantly among these species. The different topology of haplotype nets and the unequal distribution of haplogroups on the range point out at different evolutionary history of the species and at various directions of colonization throughout the contemporary area of distribution.

Изучению филогенетических отношений лососевых рыб семейства Salmonidae уделяется пристальное внимание в течение последних десятилетий (Norden, 1961; Behnke, 1972; Stearley&Smith, 1993; Phillips&Rub, 2001). В результате этих исследований были определены основные этапы и обозначены пути эволюции этого семейства. В настоящее время филогенетические построения проводятся преимущественно на основании сравнения нуклеотидных последовательностей как отдельных участков митохондриальной и ядерной ДНК, так и комбинаций различных генов (Crespi, Fulton, 2004; Bernachez, 2004). Вне зависимости от используемых для этой цели участков митохондриального и/или ядерного генома взаимоотношения между родами в пределах семейства Salmonidae остаются неизменными. Род *Oncorhynchus* располагается на вершине эволюционного древа семейства Salmonidae, и, таким образом, тихоокеанские лососи являются самыми молодыми представителями лососевых рыб. В течение многих лет вопрос взаимоотношений между тремя родами — тихоокеанскими лососями (*Oncorhynchus*), благородными лососями (*Salmo*) и гольцами (*Salvelinus*) — оставался дискуссионным. Представление о том, что рода *Oncorhynchus* и *Salmo* представляют собой сестринские клады, было опровергнуто на основании молекулярно-генетических исследований, и, таким образом, наиболее близкими и наиболее молодыми таксонами являются гольцы и тихоокеанские лососи (Crête-Lafrenierenetal, 2012).

Тихоокеанские лососи рода *Oncorhynchus* обитают в Северной Пацифике; ареалы большинства видов этого рода в значительной степени перекрываются, и, в первую очередь, это относится к американской части ареалов. В Азии, напротив, области распространения видов в ряде регионов не соответствуют друг другу. Все тихоокеанские лососи моноциклически, некоторые виды строго анадромны, другие образуют также жилые формы. Как виды, так и популяции различаются продолжительностью как пресноводного и морского периодов, так и жизненного цикла в целом. Для тихоокеанских лососей характерен «хоминг», т. е. возвращение после морского нагула на нерест в родную реку. Собственно, это явление и способствовало формированию у лососей достаточно выраженной популяционной структуры. При этом следует отметить, что уровень хоминга существенно различается от вида к виду.

Термин «филогеография» в качестве обозначения новой научной дисциплины, изучающей географическое распространение внутривидовых генных потоков, был предложен Дж. Эйвизом (Avice et al., 1987). Проецирование внутривидовой популяционной полиморфизма генов на ареал вида позволяет проследить его эволюционную историю и стратегию освоения современного ареала. Значимость филогеографических исследований не ограничивается сугубо фундаментальным вкладом в расширение знаний о паттернах распространения вида; потенциал этих исследований с точки зрения рациональной эксплуатации видов с учетом сохранения их природного биоразнообразия, вне всякого сомнения, значителен и по сей день недооценен.

Исследованию филогеографии некоторых видов тихоокеанских лососей посвящен ряд работ (Bickham, 1995; Smith et al., 2001; Churikov, Gharrett, 2002; Yoon et al., 2008; Yu et al., 2010; Маляр, Брыков, 2016; Хрусталева, 2016). Тем не менее нам представляется целесообразным провести сравнительное исследование нескольких наиболее генетически близких видов рода *Oncorhynchus*, в особенности учитывая их схожую эволюционную историю и значительное перекрывание ареалов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Нами было проанализировано свыше четырех тысяч образцов особей, принадлежащих к пяти видам тихоокеанских лососей: чавыче (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum 1792), кижучу (*O. kisutch* Walbaum 1792), нерке (*O. nerka* Walbaum 1792), кете (*O. keta* Walbaum 1792) и горбуше (*O. gorbuscha* Walbaum 1792). Материал был собран сотрудниками ВНИРО, Камчат-

НИРО, ХфТИНРО, МагаданНИРО, а также передан из США и Канады в рамках обмена генетическими образцами между странами-членами НПАФК. Характеристика исследованного материала представлена в таблице 1.

Таблица 1. Объем материала и количество митохондриальных гаплотипов для каждого из видов тихоокеанских лососей

Вид	Количество образцов	Количество выборок	Число рек	Количество гаплотипов
Чавыча	117	5	4	10
Кижуч	270	12	12	11
Нерка	1374	43	42	70
Кета	774	31	24	87
Горбуша,	1873	60	35	112
в том числе:				
четных лет нереста	720	24	19	73
нечетных лет нереста	1153	36	28	56

Выделение и очистку ДНК проводили методом абсорбции на колонках PALL (Ivanova et al., 2006).

Реакцию амплификации фрагментов мтДНК проводили в объеме 15 мкл: 1,5 мкл 10X ПЦР-буфер (Sileks, Russia), 2,5 mM MgCl₂, 0,6 mM dNTP, 2 пМ каждого праймера, 100 нг ДНК и 1 ед. HotTaq-polymerase (Sileks).

Для амплификации фрагмента гена цитохрома b (Cytb) длиной 1018–1067 пар использовались праймеры L14795 TAATGGCCAACCTCCGAAAA и H15844 AGCTACTAGGGCAGGCTCATT (Радченко, 2004).

Секвенирование проводили с обоих концов на автоматическом секвенаторе ABI 3500 с использованием набора для секвенирования BigDye v.3.1.

Обработку продуктов секвенирования, множественное выравнивание последовательностей и построение филограм на основании алгоритма максимального правдоподобия (maximum likelihood) осуществляли в программе Geneous 6.0.5 (<http://www.geneious.com>; Kearse et al., 2012).

Для представления филогенетических отношений между гаплотипами использовали метод максимальной экономии (Templeton et al., 1992), реализованный в программе TCS (Clement et al., 2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чавыча. По результатам анализа особей из трех рек Восточной и одной реки Западной Камчатки было выявлено 10 митохондриальных гаплотипов, которые принадлежали к одной и той же гаплогруппе. Для проведения сравнительного анализа и построения дендрограммы генетического сходства (рис. 1) был добавлен гаплотип цитохрома b чавычи из Северной Америки, штат Вашингтон (Генбанк#JX960820), при-

надлежащий к другой гаплогруппе и отличающийся от центрального и массового гаплотипа камчатской чавычи OTS-H1 на три нуклеотидных замены.

Кижуч. Исследования митохондриального полиморфизма кижуча охватывали значительную часть азиатской части ареала этого вида: Восточную Камчатку, Западную Камчатку и Сахалин. В пределах исследованной совокупности образцов обнаружено 11 гаплотипов, которые почти равномерно распределились между двумя гаплогруппами (рис. 2); в изученной нами азиатской части ареала существенно преобладала гаплогруппа А. Расстояние между центральными гаплотипами составило пять нуклеотидных замен. Все три проанализированные выборки с острова Сахалин оказались мономорфны по гаплотипу А-1.

Нерка. Имеющиеся в нашем распоряжении образцы нерки позволили выполнить сравнительный анализ практически по всему ареалу. Большинство особей принадлежали к одной из двух основных гаплогрупп, центральные гаплотипы которых отличались на четыре нуклеотидных замены (рис. 3). Гаплогруппа S распространена по всему ареалу, в то время как N (за редким исключением) — на азиатском континенте и близлежащих островах, а также на Аляске. В ряде популяций Британской Колумбии и Южной Аляски был обнаружена третья гаплогруппа E, удаленная от группы S на три замены. Для большинства островных популяций было показано существенное снижение гаплотипического разнообразия. Наиболее выражено это явление наблюдалось на Командорских островах, где присутствовали гаплотипы только группы N.

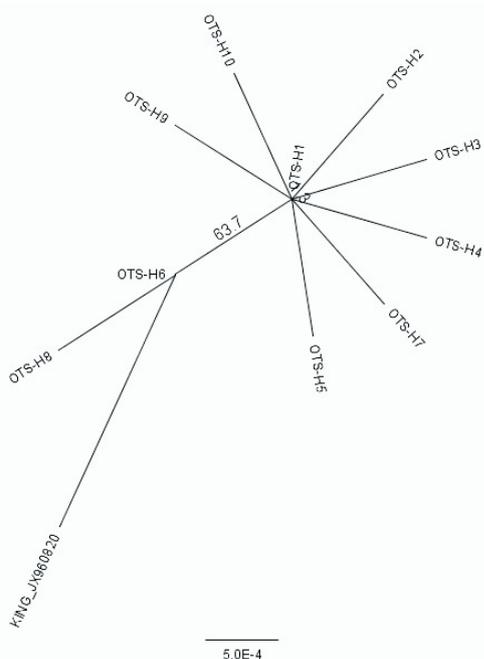


Рис. 1. Бескорневое филогенетическое дерево последовательностей гена цитохрома b чавычи

Кета. Филогенетическое дерево кеты оказалось наиболее разветвленным (рис. 4). Помимо двух основных гаплогрупп А и В, различающихся двумя нуклеотидными заменами, мы выделяем еще три. В пределах исследованной нами российской части ареала этого вида преобладают гаплотипы группы А, суммарные частоты которых в выборках из большинства регионов превышают таковые для всех прочих гаплотипов; исключение составляют два региона — Южное Приморье и Южные Курилы. В Южном Приморье отмечено заметное преобладание гаплотипов группы В и произошедшей от нее группы С. Помимо этого региона последняя группа была обнаружена только на Южных Курилах. Гаплотипы групп D и E, производные группы А, также имеют ограниченное распространение: гаплогруппа D была представлена в заметных количествах в Магаданской области и единично — в реке Амур и на острове Итуруп, а гаплогруппа E — только на Итурупе.

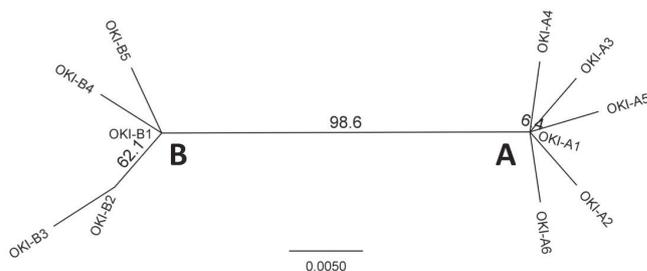


Рис. 2. Бескорневое филогенетическое дерево последовательностей гена цитохрома b кижуча. Буквами обозначены клады гаплотипов

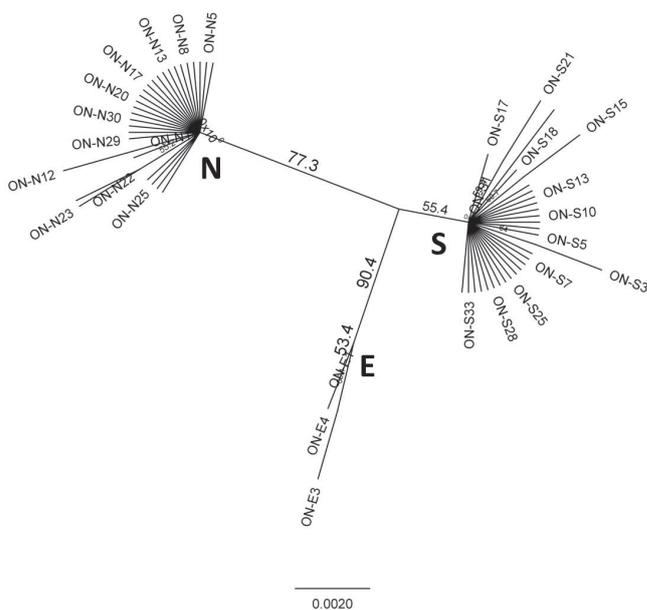


Рис. 3. Бескорневое филогенетическое дерево последовательностей гена цитохрома b нерки. Буквами обозначены клады гаплотипов

Горбуша. В результате секвенирования нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохрома *b* горбуши длиной 1018 пар нуклеотидов в 60 выборках горбуши (1873 особи) было выявлено 112 гаплотипов (рис. 5). При этом в 24 выборках (720 особей) четных лет нереста количество гаплотипов составило 73, в то время как в 36 выборках нечетных лет (1153 особи) — 56 (табл. 1). В пределах совокупности исследованных образцов был выявлен ряд массовых гаплотипов, которые присутствовали в обеих линиях горбуши в значительном количестве, в то

время как некоторые массовые гаплотипы встречаются только в одной из линий (иногда за единичными исключениями) (рис. 6). Количество уникальных гаплотипов, выявленных у 1–2 особей, заметно выше в линии четных лет нереста. Гаплотипическое разнообразие горбуши из Азии и Бристольского залива существенно превышало таковое для горбуши к югу от залива Аляска, что было отмечено для обоих поколений. В то же время «четная» горбуша Южных Курил по уровню полиморфизма и составу гаплотипов была сходна с азиатской горбушей, а «нечет-

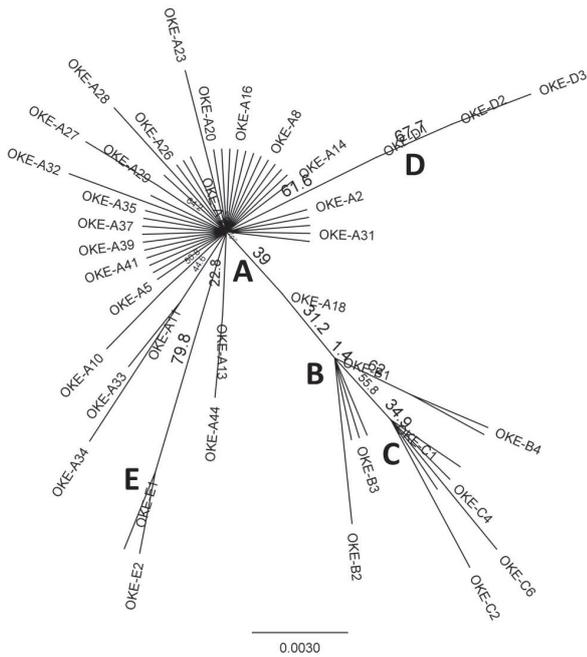


Рис. 4. Бескорневое филогенетическое дерево последовательностей гена цитохрома *b* кеты. Буквами обозначены клады гаплотипов

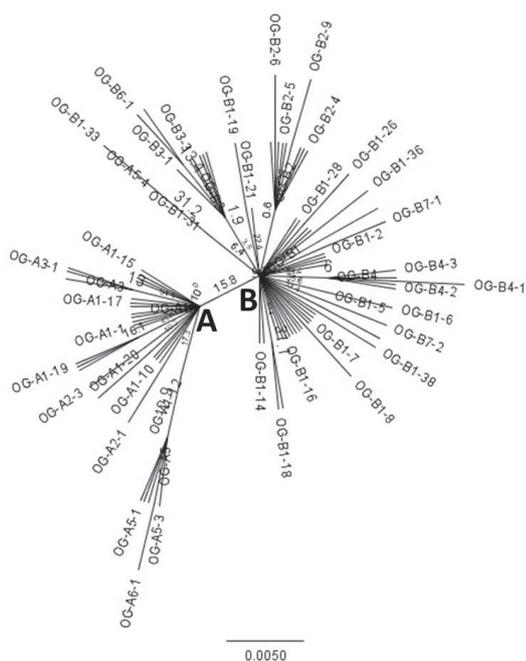


Рис. 5. Бескорневое филогенетическое дерево последовательностей гена цитохрома *b* горбуши

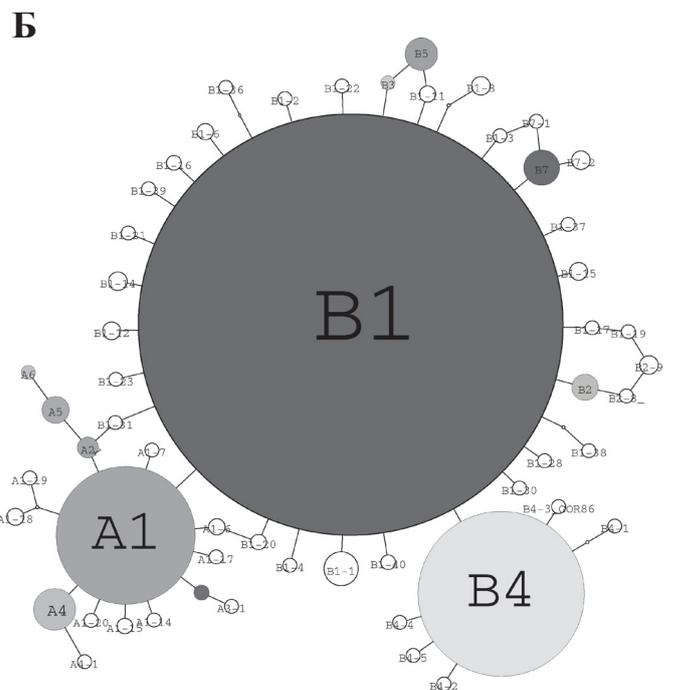
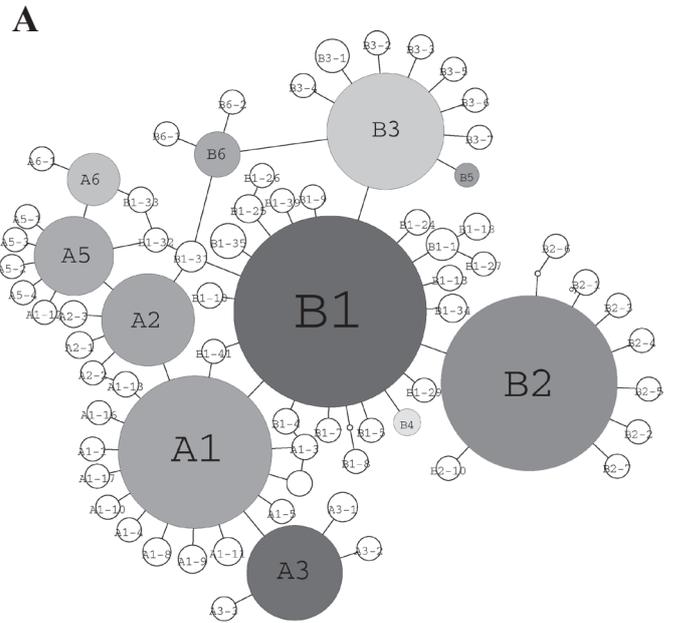


Рис. 6. Сеть митохондриальных гаплотипов горбуши четных (А) и нечетных (Б) лет нереста. Одни и те же гаплотипы показаны одинаковым цветом

ная» — с горбушей из южной части американского ареала.

Представленное исследование представляет собой первую попытку обобщить полученные в течение ряда лет данные секвенирования гена цитохрома b мтДНК тихоокеанских лососей. Наиболее полные сведения были получены для трех видов — нерки, горбуши и кеты, причем для первых двух были охвачены их ареалы практически полностью.

Для нерки и кижуча было показано существование двух основных гаплогрупп, различающихся четырьмя и пятью нуклеотидными заменами соответственно. Третья гаплогруппа у нерки была обнаружена только на юге североамериканской части ареала. Весьма вероятно, что подобная картина характерна и для кижуча, на что указывают исследования генетического полиморфизма в популяциях американского побережья (Smith et al., 2001).

Ареал кеты на азиатском побережье Тихого океана простирается южнее, чем у двух вышеупомянутых видов. Гаплотипический состав в популяциях Южного Приморья существенно отличается от такового из прочих регионов, что может служить доказательством преимущественного заселения этого района кетой, принадлежащей к другой филогруппе, отличной от доминирующей в других частях ареала. Данная гипотеза была сформулирована ранее (Маляр, Брыков, 2016) по результатам сравнительных исследований кеты и тайменя Приморья и Сахалина.

В двух линиях горбуши (четных и нечетных лет нереста) был выявлен принципиально различающийся состав гаплотипов. Как было показано ранее (Churikov, Gharrett, 2002), современная генетическая структура горбуши отражает расселение дивергировавших ранее линий горбуши по современному ареалу после Висконсинского оледенения. Полученные данные по пространственному распределению гаплотипов подтверждают независимое распространение горбуши из одних и тех же рефугиумов в каждой из линий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволили исследовать гаплотипическое разнообразие тихоокеанских лососей и проследить распределение гаплотипов по ареалам. Однако для детального изучения общей эволюционной истории данного комплекса видов требуется выполнение дополнительных статистической обработки и филогенетических построений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Маляр В.В., Брыков В.А. 2016. Генетическая изменчивость у анадромных рыб кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) и саха-

линского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856) из Северо-Западной Пацифики как отражение осцилляций палеоклимата // Биология моря. Т. 42. № 4. С. 289–299.

Радченко О.А. 2004. Изменчивость нуклеотидных последовательностей гена цитохрома b митохондриальной ДНК гольцов рода *Salvelinus* // Генетика. Т. 40. № 3. С. 322–333.

Хрусталева А.М. 2016. Филогеография азиатской нерки *Oncorhynchus nerka* по данным изменчивости митохондриальных локусов ОНП: анализ сценариев послеледникового расселения вида на азиатском побережье Тихого океана // Изв. ТИПРО. Т. 186. С. 93–106.

Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics // Ann. Rev. Ecol. Syst. V. 18. P. 489–522.

Behnke R.J. 1972. The systematics of salmonid fishes of recently glaciated lakes // J. Fish. Res. Bd. Can. V. 29. P. 639–671.

Bernatchez L. 2004. Ecological theory of adaptive radiation. In: Hendry AP, Stearns SC, editors. Evolution illuminated: salmon and their relatives. New York: Oxford University Press. P. 175–207.

Bickham J.W., Wood C.C., Patton J.C. 1995. Biogeographic implications of cytochrome b sequences and allozymes in Sockeye (*Oncorhynchus nerka*). J. Heredity V. 86. P. 140–144.

Churikov D., Gharrett A.J. 2002. Comparative phylogeography of the two pink salmon broodlines: an analysis based on a mitochondrial DNA genealogy // Molecular Ecology. V. 11. P. 1077–1101.

Clement M., Posada D., Crandall K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // Molecular Ecology. V. 9. P. 1657–1659.

Crespi B.J., Fulton M.J. 2004. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny // Mol. Phyl. Evol. V. 31. P. 658–679.

Crête-Lafreniere A., Weir L.K., Bernatchez L. 2012. Framing the salmonidae family phylogenetic portrait: a more complete picture from increased taxon sampling // PLoS ONE. V. 7. P. 646–662.

Ivanova N.V., deWaard J., Hebert P.D.N. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Molecular Ecology Notes. V. 6. P. 998–1002.

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // Bioinformatics. V. 28. P. 1647–1649.

Norden C.R. 1961. Comparative osteology of representative salmonid fishes, with particular reference to the grayling (*Thymallus arcticus*) and its phylogeny // J. Fish. Res. Bd. Can. V. 18. P. 679–791.

Phillips R.B., Rab P. 2001. Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update // Biol. Rev. V. 76. P. 1–25.

Smith C.T., Nelson R.J., Wood C.C., Koop B.F. 2001. Glacial biogeography of North American coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Molecular Ecology. V. 10. P. 2775–2785.

Stearley R.F., Smith G.R. 1993. Phylogeny of the Pacific trouts and salmon (*Oncorhynchus*) and genera of the family Salmonidae // Trans. Am. Fish. Soc. V. 122. P. 1–33.

Templeton A.R., Crandall K.A., Sing C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation // Genetics. V. 132. P. 619–633.

Yoon M., Sato S., Seeb J.E., Brykov V., Seeb L.W., Varnavskaya N.V., Wilmot R.L., Jin D.H., Urawa S., Urano A., Abe S. 2008. Mitochondrial DNA variation and genetic population structure of chum salmon *Oncorhynchus keta* around the Pacific Rim // J. Fish Biol. V. 73. P. 1256–1266.

Yu J.N., Azuma N., Yoon M., Brykov M., Urawa S., Nagata M., Jin D.-H., Abe S. 2010. Population genetic structure and phylogeography of masu salmon (*Oncorhynchus masou masou*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses // Zool. Sci. V. 27. P. 375–385.