

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НЕРКИ
ONCORHYNCHUS NERKA (WALBAUM)
КОМАНДОРСКИХ ОСТРОВОВ
НА ОСНОВАНИИ ОЦЕНКИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ
МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ДНК**

Т. В. Минеева, С. Д. Павлов, Е. В. Пономарева

*Московский государственный университет (МГУ) им. М. В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра ихтиологии*

**GENETIC DIVERSITY OF SOCKEYE SALMON
ONCORHYNCHUS NERKA (WALBAUM) FROM
THE COMMANDER ISLANDS TO ASSESS
THE VARIABILITY OF MST-DNA**

T. V. Mineeva, S. D. Pavlov, Ye. V. Ponomaryova

*Moscow State University (MSU) by M. V. Lomonosov, Faculty of Biology,
Ichthyology department*

Нерка *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) является ценным объектом промысла, обладает высокой численностью стад, экологической пластичностью, значительным фенетическим и генетическим разнообразием, что делает ее интересным для изучения объектом популяционной генетики. Генетическое разнообразие этого вида лососей достаточно хорошо изучено на всем его ареале. Однако некоторые популяции в силу своей труднодоступности и изолированности (в частности – командорская) продолжают оставаться слабо исследованными.

Командорский архипелаг является единственной группой островов в составе Командоро-Алеутской островной гряды, которая находится на территории России. Ихтиофауна и, в частности, нерка Командорских островов очень слабо изучена. Первая работа по исследованию генетических особенностей нерки этих островов была выполнена в 2014 г. О. А. Пильганчук, однако в этой работе данный вид представлен лишь одной выборкой из оз. Саранного (Пильганчук, 2014), поэтому сведений о межпопуляционных взаимоотношениях командорской нерки автором получено не было. В нашей работе впервые представлены данные о межпопуляционных взаимоотношениях командорской нерки. Результаты настоящей работы в дальнейшем могут послужить базой для более подробного изучения локальных стад командорской нерки.

Для популяционно-генетического анализа командорской нерки были выбраны маркеры микросателлитной ДНК (SSR, MST) как наиболее

подходящий для поставленных задач тип генетических маркеров (Животовский, 2006; Хрусталева, 2007).

Целью работы являлось изучение генетического разнообразия нерки, воспроизводящейся во внутренних водоемах о. Беринга Командорского архипелага по микросателлитным маркерам. В задачи входило: оценить популяционную значимость выбранных микросателлитных маркеров для анализа популяций нерки из рек о. Беринга; изучить генетическое разнообразие популяций нерки этого острова по микросателлитным маркерам; сравнить генетические отношения берингийской нерки с камчатскими популяциями вида по данным изменчивости микросателлитной ДНК.

Материал по нерке в водоемах о. Беринга был собран Т. В. Минеевой, сотрудником кафедры ихтиологии биофака МГУ А. М. Малютиной, а также сотрудниками Командорского государственного природного биосферного заповедника в период с июля по сентябрь 2013 г. на о. Беринга в реках Гаванская и Саранная. Для сравнения использован генетический материал нерки, собранный сотрудниками кафедры ихтиологии биофака МГУ в предыдущие годы.

Популяции нерки водоемов о. Беринга представлены двумя выборками – 29 особями из р. Гаванской и 49 из р. Саранной (проходные). Камчатские популяции были представлены четырьмя выборками – 30 особями из оз. Азабачьего (проходные), 30 из оз. Кроноцкого (кокани) и по 40 особей из озер Курильское (проходные) и Копылье (т. н. жилая или “residual”).

Анализ полиморфизма микросателлитной ДНК проводился на кафедре ихтиологии биофака МГУ и на базе кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН.

Кусочки плавников нерки фиксировались в 96 %-ном растворе этанола, проводилось выделение ДНК на колонках и затем амплификация по четырем микросателлитным локусам – One 105, One 112, Ots 100, Omm 1070. Амплификационная смесь объемом 10 мкл содержала буфер для ПЦР, 2 mM MgCl₂, 1.5 mM смесь dNTP, по 0.7 пкМоль на реакцию forward и reverse праймеров для каждого локуса, Taq-полимеразу 0.6 единиц на реакцию, до конечного объема смесь доводилась деионизованной водой. Амплификацию микросателлитных фрагментов проводили в термочиклере по заданной программе, включавшей денатурацию в течение 4 минут при 95 °C, затем 33 цикла: 10 сек. при 92 °C, отжиг 20 сек. при 56 °C, элонгацию 20 сек. при 72 °C, затем заключительную элонгацию 10 мин при 72 °C и охлаждение 10 мин при 10 °C. Проводили денатурацию амплифицированных двуцепочечных фрагментов и разделение продуктов амплификации методом капиллярного электрофореза.

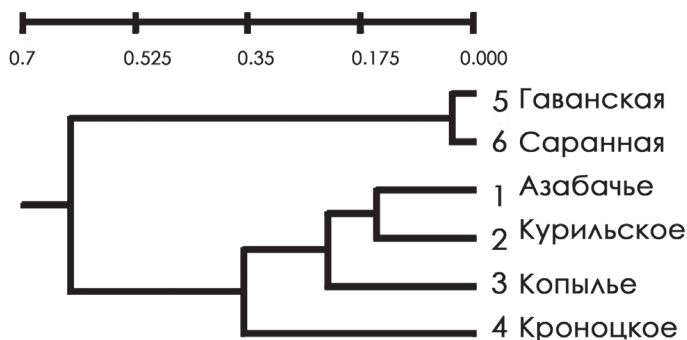
Генотипирование выполняли при помощи программного обеспечения GeneMarker v.2.1. Основные генетические показатели популяций были получены с использованием программ GENEPOP v.4.2, TFPGA и FSTAT v.2.9.3. Тесты на равновесие Харди-Вайнберга проводили в программе GENEPOP v.4.2. Частоты аллелей, ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность, аллельное разнообразие и ожидаемое количество аллелей в выборке рассчитывались в FSTAT v.2.9.3. Расчет матрицы дистанций Нея и построение UPGMA-дендрограммы проводились в программе TFPGA. Межпопуляционная дифференциация аллельных частот оценивалась с помощью программы GENEPOP. Многомерное шкалирование как альтернативный метод кластеризации изученных выборок проводилось при помощи пакета Statistica 6.0.

Рассчитаны основные генетические показатели для выборок командорской нерки и нерки Камчатки. Все проанализированные популяции соответствуют равновесию Харди-Вайнберга. Выявлены различия между изученными выборками командорской и камчатской нерки по всем полученным нами генетическим характеристикам.

Исследованные микросателлитные локусы командорской нерки и нерки Камчатки оказались полиморфными, число аллелей на локус составляло от 3 до 21 (среднее – 10.8). Всего было обнаружено 53 разных аллеля, из них 43 общих для командорских и камчатских выборок, 2 специфичных только для командорских, а 8 – для камчатских выборок. Максимальное число аллелей на локус – 21, наблюдалось в выборке из р. Гаванской по локусу One 112. Минимальное – 3, в выборке из р. Саранной и оз. Копылье по локусу One 105. В общем случае наблюдаемая гетерозиготность в выборках командорской нерки ниже, чем в камчатских. Наиболее полиморфным локусом в выборках командорской нерки был One 112, а в выборках камчатской нерки – Omm 1070. Среднее число аллелей по локусам: One 105 – 4, One 112 – 17.5, Omm 1070 – 13.2, Ots 100 – 8. Число различных аллелей по локусу One 105 в исследованных выборках командорской нерки составило 4, по локусу One 112 – 21, Ots 100 – 8, Omm 1070 – 12.

Командорская и камчатская нерка достоверно различалась по частотам микросателлитных локусов ($p < 0.001$) и образовывала два обособленных кластера на UPGMA-дендрограмме (рисунок) и графиках многомерного шкалирования, несмотря на относительно небольшое географическое расстояние между командорскими и камчатскими популяциями.

Аналогичные результаты для островных популяций нерки ранее были получены другими исследователями (Beacham et al., 2006; Yamamoto et al., 2011; Пильганчук, 2014).



UPGMA-дендрограмма, построенная на основании полиморфизма микросателлитных локусов

Значительную генетическую дивергенцию между камчатской и командорской неркой, несмотря на относительно небольшое географическое расстояние между о. Беринга и Камчаткой (250 км), вероятно, можно объяснить разным происхождением камчатских и командорских популяций нерки. Выявленные достоверные различия по микросателлитным локусам между двумя выборками берингской нерки ($p < 0.05$), из рек, устья которых расположены на расстоянии ~ 15 км, по-видимому, обусловлены наличием у нерки строгого хоминга. Можно предположить, что различия генетических характеристик микросателлитных локусов в исследованных выборках командорской нерки и нерки из водоемов Камчатки во многом определяются также изолированностью островных популяций, их предполагаемыми малыми размерами и отсутствием потока генов между островами и материком. Вероятно, генетические характеристики островных популяций в большей степени, чем материковых (вследствие их малой численности), определяются стохастическими процессами. Микросателлитные локусы характеризуются высокой скоростью мутирования, чувствительностью к стохастическим процессам и, следовательно, являются эффективными маркерами для дифференциации островных популяций нерки.

Таким образом, выбранные микросателлитные маркеры позволили выявить значимые различия между популяциями камчатской и командорской нерки и между командорскими популяциями. Выявленные различия ставят вопрос о происхождении командорской нерки.

ЛИТЕРАТУРА

Животовский Л. А. 2006. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Информ. Вестн. ВОГиС. Т. 10. № 1. С. 74–96

Пильганчук О. А. 2014. Генетическая структура нерки, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), полуострова Камчатка : дис. ... канд. биол. наук. Владивосток : ИБМ им. А. В. Жирмунского ДВО РАН. 135 с.

Хрусталева А. М. 2007. Комплексный метод дифференциации нерки (*Oncorhynchus nerka*) азиатских стад. М. : Изд-во ВНИРО. 165 с.

Beacham T. D., McIntosh B., MacConnachie C., Miller K. M., Withler R. E., Varnavskaya N. 2006. Pacific rim population structure of sockeye salmon as determined from microsatellite analysis // Transactions of the American Fisheries Society. Vol. 135. № 1. P. 174–187.

Yamamoto S., Kitamura S., Sakano H., Morita K. 2011. Genetic structure and diversity of Japanese kokanee *Oncorhynchus nerka* stocks as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA markers // J. Fish Biology. Vol. 79. № 5. P. 1340–1349.