

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КАМЧАТСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ
МИКИЖИ *PARASALMO (ONCORHYNCHUS) MYKISS***

М. Н. Мельникова, А. Л. Сенчукова, С. Д. Павлов
Московский государственный университет (МГУ)
им. М. В. Ломоносова, кафедра ихтиологии

**ASSESSMENT OF EFFICIENCY OF ISSR MARKERS
APPLICATION FOR GENETIC DIFFERENTIATION OF
THE KAMCHATKA MYKISS POPULATIONS *PARASALMO*
*(ONCORHYNCHUS) MYKISS***

M. N. Melnikova, A. L. Senchukova, S. D. Pavlov
Moscow State University (MSU) by M. V. Lomonosov,
Department of Ichthyology

Вид микижа *Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* является одним из интереснейших представителей рода *Parasalmo (Oncorhynchus)*, демонстрирующим высокую адаптивность, морфологическую пластичность и исключительно широкое распространение. В азиатской части ареала микижа вызывает особый научный и практический интерес, т. к. здесь вид представлен в основном дикими популяциями, сохранившими свою первозданную популяционную структуру. Важной особенностью камчатской группы популяций микижи является обедненность генома на азиатской части ареала (Павлов и др., 2004) и малое число эффективных популяционно-генетических маркеров. Данное исследование направлено на разработку новых методик и увеличение числа популяционно значимых генетических маркеров за счет анализа малоизученных участков ДНК.

Высокой вариабельностью, которую можно использовать при популяционном анализе, обладают локусы межсателлитной ДНК (ISSR-PCR-inter-microsatellite-PCR) (Zietkiewicz et al., 1994). Для изучения популяционно-генетических отношений камчатской микижи этот метод не применялся. В работе производится оценка эффективности применения этих маркеров для генетической дифференциации камчатских популяций микижи.

Материал был собран от разных форм *Parasalmo (O.) mykiss*, обитающих в наиболее крупных реках и водных бассейнах Камчатки, а также от чилийских и американских популяций. Всего в проведенный нами

анализ вошли девять популяций, характеризующих камчатский ареал микижи в целом. Пять популяций представляли западное побережье Камчатки (реки Тигиль, Седанка, Утхолок, Сопочная, Коль) и четыре популяции восточное побережье (реки Жупанова, Быстрая, Двухюрточная, Еловка). В качестве реперов использовали камчатскую выборку симы *Oncorhynchus masou*, а также выборки из североамериканских и чилийских популяций.

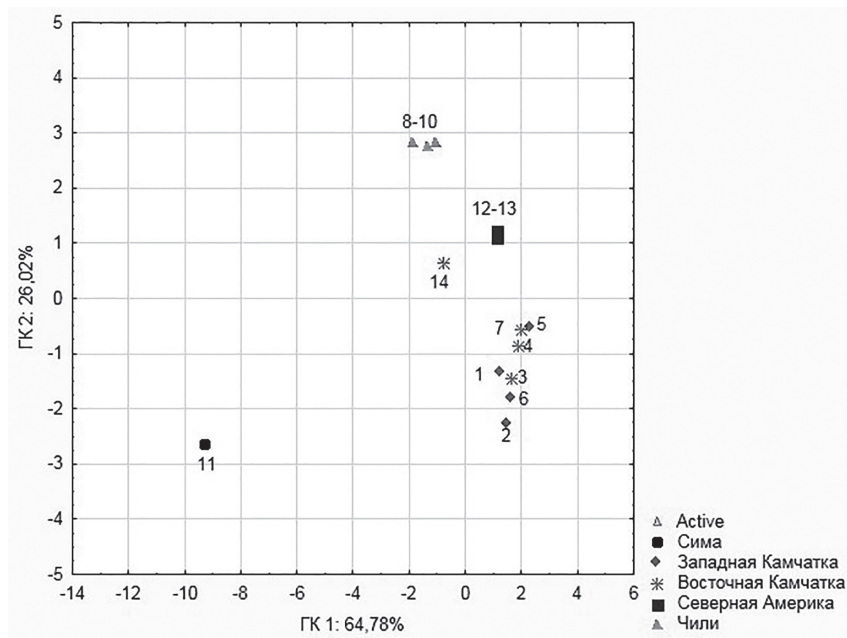
Выборки североамериканской микижи содержали прибрежную – coastal и материковую (рыборазводную) – inland формы. Чилийская микижа была представлена рыборазводной и эстуарной формами. Методика выделения ДНК, тест на ее количество и качество, подбор ISSR-праймеров, условия PCR-реакции подробно описаны нами в методической работе по разработке ISSR-маркеров (Мельникова и др., 2010).

Оценку частот нуль-аллелей рассчитывали по формуле Л. А. Животовского для диплоидных объектов, исследованных мультилокусными доминантными ДНК-маркерами (Zhivotovsky, 1999). Аллельное разнообразие оценивали согласно руководству Вейра (Вейр, 1995), статистическую ошибку, дисперсию и критерий Стьюдента рассчитывали следуя обычным рекомендациям. Степень дифференциации популяций (θ_{st} (Zhivotovsky, 1999)) оценивали с использованием программы GDA. На основе матрицы коэффициентов попарного сходства определяли координаты каждой выборки в пространстве главных компонент изменчивости по программе Statistica 10.

Мы рассчитали аллельное разнообразие для семи ISSR-маркеров. Полученные величины средней гетерозиготности находились в пределах от 0.118 (микижа из р. Утхолок) до 0.221 (микижа из р. Еловки), что свидетельствует о достаточной информативности используемых ISSR-маркеров. Ошибка находилась в интервале 0.069 – 0.239, что показывает большую вариабельность маркеров. Статистически достоверные отличия ($p < 0.05$) были найдены между микижей из р. Сопочной и р. Седанки, р. Двухюрточной и р. Жупановой, р. Еловки и р. Быстрой, между микижей из р. Быстрой и североамериканскими популяциями, между микижей из р. Тигиль и чилийскими популяциями, микижей из р. Быстрой и двумя чилийскими популяциями, между чилийскими популяциями микижи, а также между двумя формами inland и coastal североамериканских популяций микижи. Сима, использованная в качестве репера, имеет достоверные отличия от популяций микижи из рек Еловка и Быстрая и от североамериканских популяций.

Величина межпопуляционной дифференциации, измеряемая показателем θ_{st} (аналог F_{st} (Zhivotovsky, 1999)), определяет долю межпопуляционной изменчивости в общей изменчивости. В среднем по всем локусам

она принимала значение 33.5 %, выступая статистически значимой величиной, что указывает на значительную дифференциацию популяций микижи по изученным локусам. Отношения между изученными популяциями по полученным результатам наглядно продемонстрированы на графике в пространстве главных компонент (рисунок по первой и второй компоненте), построенном по матрице значений θ_{ST} между всеми парами выборок (Zhivotovsky, 1999), где показано географическое подразделение камчатских популяций микижи от чилийских и североамериканских.



Генетическая дифференциация микижи в пространстве главных компонент по программе Statistica 10 по первой и второй компонентам

Восточно- и западнокамчатские популяции оказались близки между собой. Это можно объяснить местоположением рек Камчатки. Ряд притоков восточного камчатского бассейна (включая реки Быстрая, Двухюрточная, Еловка) берут начало в высокогорной тундре Срединного Камчатского хребта, откуда текут и многие западнокамчатские реки (включая реки Тигиль, Утхол, Седанка). Наибольшей обособленностью отличается восточнокамчатская популяция микижи из р. Жупановой. Показаны значительные отличия этой популяции от остальных популяций

камчатской микижи и близость к североамериканским выборкам по данному типу маркеров. На нынешнем этапе исследования этот факт сложно объяснить, что требует дополнительного изучения и сопоставления с результатами исследований камчатской микижи по другим популяционно-генетическим маркерам.

Североамериканские и чилийские выборки уверенно отличаются от камчатской группы и между собой (рисунок). Рассмотренная в качестве репера сима *Oncorhynchus masou* в наибольшей степени обособлена от исследованных выборок (θ_{ST} принимает значения от 37.5 до 50 %). Выявленный уровень различий можно считать видовым по данному типу маркеров.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04001437 и Программы «Ведущие научные школы» (контракт НШ 719.2012.4). Использовалась материально-техническая база кафедры ихтиологии МГУ, ИПЭЭ РАН им. А. Н. Северцова.

ЛИТЕРАТУРА

- Вейр Б. 1995. Анализ генетических данных. М. : Мир. 399 с.
- Мельникова М. Н., Сенчукова А. Л., Павлов С. Д. 2010. Разработка новых популяционно-генетических маркеров для вида *Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* на основе вариабельности межсателлитной ДНК // ДАН. Т. 435. № 1. С. 1–4.
- Павлов С. Д., Колесников А. А., Мельникова М. Н., Ушакова М. В. 2004. Генетическая дивергенция камчатской микижи (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss*) на ареале по результатам рестрикционного анализа и секвенирования гена цитохрома b мтДНК // Генетика. Т. 40. № 12. С. 1695–1701.
- Zivotovsky L. A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers // Molecular Ecology. Vol. 8. № 6. P. 907–913.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. Vol. 20. № 2. P. 176–183.