

**МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ НЕРКИ  
*ONCORHYNCHUS NERKA* WALBAUM КАМЧАТКИ  
И КОМАНДОРСКИХ ОСТРОВОВ**

***Е. В. Пономарева\**, *М. В. Холодова\*\**, *М. Н. Мельникова\**,  
*Т. В. Минеева\**, *С. Д. Павлов\****

*\*Московский государственный университет (МГУ)*

*им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет*

*\*\*ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции (ИПЭЭ)*

*им. А. Н. Северцова, Москва*

**MICROSATELLITE ANALYSIS OF THE SOCKEYE  
SALMON *ONCORHYNCHUS NERKA* WALBAUM  
OF KAMCHATKA AND COMMANDER ISLANDS**

***E. V. Ponomareva\**, *M. V. Kholodova\*\**, *M. N. Mel'nikova\**,  
*T. V. Mineeva\**, *S. D. Pavlov\****

*\*M. V. Lomonosov Moscow State University, Biology department*

*\*\*A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow*

Нерка *Oncorhynchus nerka*, имеющая амфипацифичное распространение, является важнейшим промысловым видом, изучение которого является одной из приоритетных задач для многих стран. В азиатской части ареала нерка представлена в основном дикими популяциями, исследование генофонда которых особенно важно для сохранения вида в целом. Несмотря на то, что генетическое разнообразие нерки по маркерам микросателлитной ДНК достаточно хорошо изучено на большей части ареала, генетическая дифференциация нерки внутри некоторых отдельных локальностей и, в частности, жилой формы нерки оз. Кроноцкого и водоемов Командорских островов остается малоизученной.

Известно, что кокани в оз. Кроноцком образуют две формы по типу питания, отличающиеся друг от друга по ряду меристических признаков. «Планктофаги» – особи, во взрослом состоянии питающиеся преимущественно планктоном, «бентофаги» – особи, питающиеся во взрослом состоянии в основном бентосом. Считается, что эти две формы репродуктивно изолированы. Данный факт до настоящего момента не был подтвержден методами молекулярно-генетического анализа.

Генетическая дифференциация «остаточной» формы нерки из оз. Копылье и проходной нерки удаленной от материка популяции водоемов Командорских островов также не исследована.

Для изучения генетической дифференциации нерки были отобраны

10 локусов микросателлитной ДНК, широко используемых в подобных исследованиях лососевых рыб.

Исследован полиморфизм нерки из 14 выборок ( $N = 589$ ) по 10 микросателлитным локусам: One102, One105, One109, One112, One115 (Olsen et al., 2000), OMM1037, OMM1070 (Rexroad et al., 2001), Ots100, Ots107, Ots253 (Nelson et al., 1999). Обозначения и краткая характеристика выборок представлены в таблице. Для генетического анализа использовали кусочки плавников, фиксированных спиртом. Амплификация локусов проводилась в термоциклере Tetrad 2 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) по схеме: 1 цикл  $94^{\circ}\text{C}$  4 мин., затем 30 циклов по 15 сек.  $94^{\circ}\text{C}$ , 20 сек.  $T_a$ , 20 сек.  $72^{\circ}\text{C}$ , заключительная элонгация  $72^{\circ}\text{C}$  – 10 мин. Температура отжига ( $T_a$ ) для праймеров была  $56\text{--}62^{\circ}\text{C}$  (в зависимости от локуса). Перед постановкой на электрофорез разведенные амплификаты ( $\sim$  в 120 раз) денатурировали с формамидом, в каждую пробу добавлялся стандарт GeneScan™ 500 LIZ®. Капиллярный гель-электрофорез проводился в генетическом анализаторе ABI PRISM 3500. Определение длин аллелей проводили в программе GeneMarker v.1.2 (SoftGenetics LLC).

*Статистический анализ.* Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, неравновесие по сцеплению рассчитывали в программе GENEPOP V4.1 (Raymond, Rousset, 1995). В этой же программе рассчитывалась попарная дифференциация выборок. В программе Arlequin V.3.5.1.3 (Excoffier et al., 2005) вычислялась матрица попарных  $F_{st}$  и достоверность этих значений. В этой же программе анализировались AMOVA и 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 STATISTIKA 6.0 (StatSoft), используя метод многомерного шкалирования для снижения размерности матрицы.

*Обозначение, локализация и объем выборок*

№	Выборка	Обозначение	Регион	N	Форма
1	озеро Копылье	Коп	Западная Камчатка	62	«остаточные»
2	река Коль	Коль	Западная Камчатка	41	проходные
3	озеро Курильское	Курил	Западная Камчатка	52	проходные
4	озеро Азабачье	Азаб	Восточная Камчатка	30	проходные
5	озеро Начикинское	Начик	Западная Камчатка	50	проходные

Окончание таблицы

№	Выборка	Обозначение	Регион	N	Форма
6	река Кроноцкая	Кр_р	Восточная Камчатка	42	проходные
7	озеро Толмачева	Тол	Западная Камчатка	40	жилые
8	река Узон	Узо	Восточная Камчатка	28	жилые
9	озеро Кроноцкое	Кр_о	Восточная Камчатка,	43	жилые
10	ручей Аланд	Ала	Восточная Камчатка,	35	жилые
11	остров Конради	Конр	Восточная Камчатка	46	жилые
12	река Гаванская	Гав	Командорские о-ва, о-в Беринга	29	проходные
13	озеро Саранное	Сар	Командорские о-ва, о-в Беринга	48	проходные
14	озеро Жировое	Жир	Командорские о-ва, о-в Медный	43	проходные

Отклонения от равновесия Харди-Вайнберга с дефицитом гетерозигот наблюдалось в выборках из ручья Аланд и озера Курильское по локусу Ots253, из озера Толмачева по локусу One115. Ни в одной из выборок не наблюдалось неравновесие по сцеплению.

*Генетическое разнообразие.* По всей совокупности 10 исследованных локусов было выявлено 168 аллелей. Наименьшее количество выявлено в локусе OMM1037 (4 аллеля), наибольшее – в локусе OMM1070 (35 аллелей). Аллельное разнообразие в выборках было рассчитано по минимальной выборке (28 экз., река Узон) и изменялось от 1,96 до 19,0. Генетическое разнообразие варьировало от наименьшего значения в озерах Жировое и Саранное (Командорские острова, остров Медный) по локусу Ots107 – 0,068 до наибольшего – река Узон (озеро Кроноцкое) One112 – 0,952

*Генетическая дифференциация.* Высоко значимая генетическая дифференциация ( $p < 0.001$ ) наблюдалась между большинством выборок за исключением выборки из Кроноцкого озера (смешанная, нагульная) и выборок из реки Узон и района острова Конради, а также между выборками из реки Гаванской и озера Саранное (обе выборки с острова Беринга). Среднее значение  $F_{st}$  составило 0.078. Степень попарной дифференциации выборок на рассчитанных значениях  $F_{st}$  ранжировалась от 0.00219 до 0.17738. Многомерное шкалирование на основе матрицы дистанций  $F_{st}$  представлено на рисунке. В результате анализа выявлено 3 значимых оси.

По первой оси, характеризующей наибольшее разнообразие, отделялись выборки Командорских островов. По второй оси разделялись выборки из проходных популяций рек Камчатки и озера Кроноцкого. По третьей оси – выборка из озера Копылье и ручья Аланд (озеро Кроноцкое).

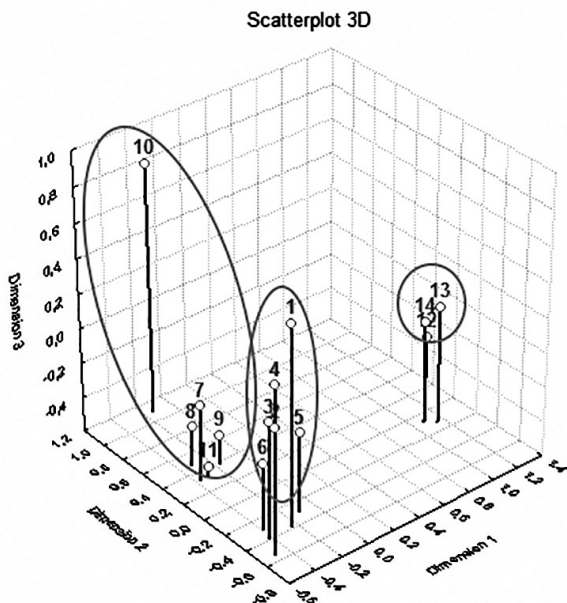


График многомерного шкалирования, в пространстве трех главных измерений.  
Цифровые обозначения выборок соответствуют таблице

Показано, что проходные камчатские популяции отличаются от островных по частотам нескольких микросателлитных локусов, значительные отличия по частотам микросателлитных локусов наблюдаются также между популяциями кокани озера Кроноцкого, остаточной формы нерки из озера Копылье и другими проанализированными популяциями. Различий по частотам исследованных локусов между двумя формами жилой нерки из озера Кроноцкого выявлено не было. Более детальное изложение этих исследований ожидается в соответствующей статье (в печати) журнала «Известия РАН. Биологическая серия».

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ, проекты 11-04-02056-а, 14-04-01437-а, 15-29-02448офи\_м), РГНФ № 14-06-00726, грантом «Ведущие научные школы» (НШ-2666.2014.4), а также РНФ № 14-50-00029 (частичная обработка материала).

## ЛИТЕРАТУРА

Olsen J. B., Wilson S. L., Kretschmer E. J., Jones K. C., Seeb J. E. 2000. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon // Mol. Ecol. Vol. 9. № 12. – P. 2185–2187.

Nelson R. J., Beachem T. D. 1999. Isolation and cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon // Anim. Genet. Vol. 30. № 3. – P. 228–229.

Rexroad C. E. III, Coleman R.L, Martin A. M., Hershberger W. K., Killefer J. 2001. Thirty five polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) //Anim. Genet. Vol. 32. № 5. – P. 317–319.