

**РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОТНОШЕНИЯ КАМЧАТСКОЙ
МИКИЖИ *PARASALMO (O.) MYKISS* WALBAUM,
ИССЛЕДОВАННЫЕ С ПОМОЩЬЮ SCAR-МАРКЕРОВ**

С. Д. Павлов*, М. Н. Мельникова*, М. В. Шитова**

**Московский государственный университет*

им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет

***ФГБУН Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова*

(ИОГен) РАН, Москва

**REGIONAL RELATIONS OF KAMCHATKA MYKISS
PARASALMO (O.) MYKISS WALBAUM, INVESTIGATED
USING SCAR-MARKERS**

S. D. Pavlov*, M. N. Mel'nikova*, M. V. Shitova**

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

***Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow*

Вид камчатская микижа *Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* отличается сложной популяционной структурой, широким (амфиацифичным) распространением и высокими темпами микроэволюции форм. Американские представители вида и их интродуценты относительно хорошо и разносторонне изучены. Микижа, распространенная на территории Камчатского полуострова, является малоизученной группой рыб в силу малодоступности мест ее обитания. Почти полное отсутствие антропогенного влияния делает изучение природных популяций микижи на Камчатке еще более интересным и актуальным. Проведенные ранее генетические исследования этой камчатской группы немногочисленны. По результатам анализа мт-ДНК группа оказалась монофилетичной и слабо дифференцированной. Таким образом, встал вопрос о подборе высокоспецифичных маркеров именно для камчатской группы *Parasalmo (O.) mykiss*. Нашим коллективом подобраны 7 SCAR-маркеров (Sequence Characterized Amplified Region – «охарактеризованный секвенированием амплифицированный район» (Мельникова и др., 2010), которые мы применили в данном анализе для большего ряда выборок *Parasalmo (O.) mykiss* на азиатской части ареала. Были использованы заспиртованные коллекции кусочков грудного плавника восьми популяций от различных экоформ микижи, обитающих в наиболее крупных речных бассейнах Камчатки. Четыре популяции представляли западное побережье Камчатки (реки Тигиль, Седанка, Утхолок, Сопочная); четыре – восточное побережье (реки Жупанова, Быстрая, Двухюрточная, Еловка). Количество образцов из каждого речного бассейна

составило от 15 до 53 экз. В качестве реперов были взяты (по 5 экз. в каждой выборке) североамериканские выборки генетических линий coastal (Quinault river, Chilliwack river) и inland (Dworshak, Crystal lake), выборки от вторично одичалой (Canalal river, Gala river) и рыборазводной чилийской группы *Parasalmo (O.) mykiss*, а также близкородственный вид сима (*Oncorhynchus masou*).

Методика выделения, тест на количество и качество ДНК, подбор SCAR-праймеров, праймеры и условия PCR-реакции подробно описаны нами в предыдущих работах (Мельникова и др., 2010). Всего было проанализировано 7 SCAR-маркеров.

Оценку частот нуль-аллелей рассчитывали по формуле Л. А. Животовского для диплоидных объектов, исследованных мультилокусными доминантными ДНК-маркерами (Животовский, 2011). Ожидаемую гетерозиготность, статистическую ошибку, дисперсию и критерий Стьюдента рассчитывали, следуя обычным рекомендациям (Мельникова и др., 2010). Степень дифференциации популяций (θ_{ST} , аналог F_{ST} (Вейр, 1995)) оценивали с использованием программы GDA. На основе матрицы коэффициентов попарного сходства определяли координаты каждой выборки в пространстве главных компонент изменчивости по программе Statistica 10.

Полученные величины средней гетерозиготности находились в пределах от 0.255 (микижа из реки Жупанова) до 0.373 (микижа из реки Еловка), что свидетельствует о достаточной информативности используемых SCAR маркеров.

Попарное сравнение величин средней ожидаемой гетерозиготности (H_e) с использованием критерия Стьюдента выявило достоверные отличия показателя разнообразия (H_e) симы ($p < 0.05$) от всех выборок микижи. Также достоверные отличия наблюдались по показателю разнообразия микижи из реки Седанка ($p < 0.038$; 0.043; 0.008) по сравнению с выборками из рек Сопочная, Утхолок и Жупанова соответственно. Уровень генетического разнообразия в этих популяциях относительно низкий.

Величина межпопуляционной дифференциации, измеряемая показателем θ_{ST} в среднем по всем локусам составила 26.9 %, что указывает на значительную дифференциацию популяций микижи по изученным маркерам.

Диапазон общих значений θ_{ST} рассчитанных для микижи из всех исследованных регионов лежит в диапазоне от 0.1 % до 24 % (таблица). По сравнению с североамериканскими популяциями, наибольший процент различий отмечается между популяциями микижи на западном и восточном побережьях Камчатки (22.4 % и 24 % соответственно). Существенные различия между западным и восточным регионами Камчатки (13 %) подтверждают, что маркеры для географического разделения камчатских популяций были выбраны верно. Меньшие, но также высокие значения θ_{ST} ,

отличали камчатские популяции микижи от чилийских популяций (21.6 % для восточных и 14.6 % для западных). Наименьший процент различия (0.8 %) выявлен между чилийскими и североамериканскими популяциями.

Оценки внутри- и межрегиональной дифференциации популяций микижи (% в единицах θ_{ST})

Регион	Сима	Восточное побережье Камчатки	Западное побережье Камчатки	Северная Америка	Чили
	Внутрирегиональная дифференциация				
	19.6	0.1	4	12.2	
	Межрегиональная дифференциация				
Восточное побережье Камчатки	40	-			
Западное побережье Камчатки	17	13	-		
Америка	25	24	22.4	-	
Чили	43	21.6	14.6	0.8	-

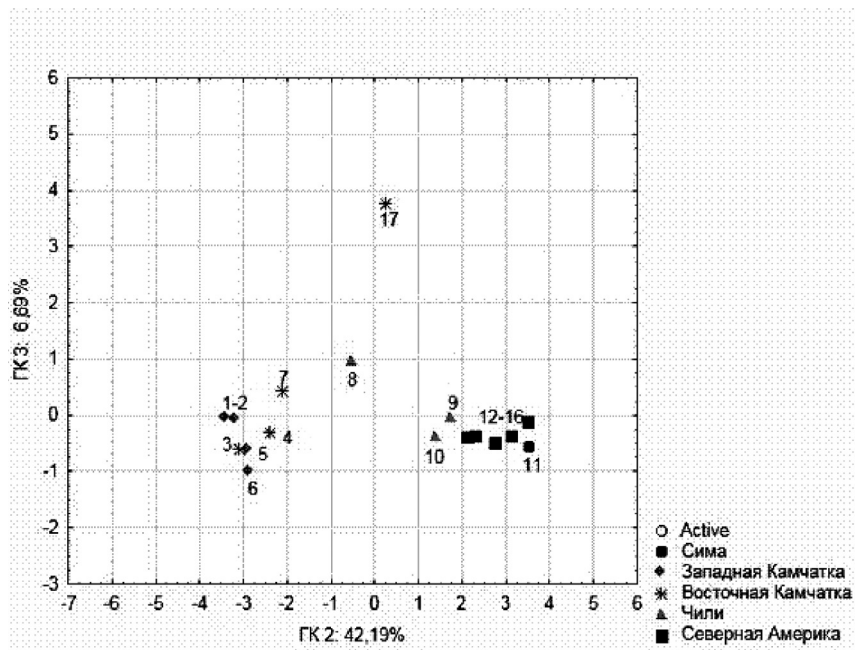
Примечание: для каждой пары сравниваемых регионов, представленных несколькими выборками, были оценены все попарные θ -значения и затем усреднены, давая среднюю оценку θ между этими регионами.

При определении уровня внутрирегиональной дифференциации популяций микижи выяснилось, что он низок у западнокамчатских и североамериканских популяций (0.1 % и 4 % соответственно) и достаточно высок у восточнокамчатских и чилийских популяций (19.6 % и 12.2 % соответственно). Это показывает, что выбранные маркеры не только демонстрируют географическую подразделенность наших выборок, но и способны выявить различия практически в каждой популяции микижи по отдельно взятой реке.

Оценки внутри – и межрегиональной дифференциации микижи наглядно отображаются в пространстве главных компонент (рисунок). График построен по матрице значений θ_{ST} между всеми парами выборок, где демонстрируется географическое подразделение восточных и западнокамчатских популяций микижи. Исключением является популяция из восточнокамчатской реки Двухюрточная, которая оказалась ближе к западным популяциям микижи. Относительная генетическая близость может быть объяснена местоположением этой реки, впадающей в бассейн реки Камчатка. Ряд притоков камчатского бассейна берут начало в высокогорной тундре срединного камчатского хребта, откуда берут начало и многие западнокамчатские реки. По данным предыдущих работ (Савваитова и др.,

1973) здесь может происходить обмен генами между популяциями микижи с разных побережий Камчатки.

Наибольшей обособленностью из камчатской группы отличается восточнокамчатская популяция микижи из реки Жупанова. Показаны значительные отличия этой популяции от остальных популяций камчатской микижи по данному типу маркеров. Выявленные отличия наиболее заметны по третьей главной компоненте. На нынешнем этапе исследования этот факт сложно объяснить, что требует дополнительного изучения.



Генетическая дифференциация региональных выборок микижи в пространстве главных компонент (Statistica 10). Примечание: Генетические координаты (главные компоненты) GK1, GK2 и GK3 получены по матрице, составленной из величин попарных межвыборочных генетических различий по SCAR – маркерам (θ ST-аналог F_{ST}). Обозначения выборок: 1, 2, 5, 6 – реки Западной Камчатки (Сопочная, Утхолок, Тигиль, Седанка); 3, 4, 7, 17 – реки Восточной Камчатки (Двухюрточная, Еловка, Быстрая, Жупанова); 8–10 – Чили (Hatcherry, Gala, Canalal); 12–16 – Северная Америка (Quinault, Chilliwack, Dwarshak, Crystal lake); 11 – *O. masou* (сима)

Отношения камчатской микижи с представителями вида из других частей ареала географически хорошо объяснимы и поддерживаются

избирательностью метода. Североамериканские и чилийские выборки оказались близки между собой, данный факт объясняется тем, что многие реки Чили зарыблялись североамериканской микижей (Павлов и др., 2007). Вместе с тем видно, что чилийский и североамериканский кластеры уверенно отличаются от камчатской группы. Вид сима, использованный в качестве репера, наиболее обособлен от исследованных выборок микижи (θ_{ST} достигает значения 43 %), выявленный уровень различий можно считать видовым по данному типу маркеров.

Таким образом, создание и применение уникальных SCAR-маркеров делает возможным региональное и популяционное подразделение монофилетичной и малодифференцированной группы камчатской микижи и открывает возможности для дальнейших филогенетических исследований этой группы.

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

- Вейр Б. 1995. Анализ генетических данных. – М. : Мир. – 399 с.
- Мельникова М. Н., Павлов С. Д., Колесников А. А., Петров Н. Б. 2010. Поиск и конструирование популяционно-генетических SCAR-маркеров для камчатской микижи *Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* // Генетика. Т. 46. № 5. – С. 792–797.
- Павлов Д. С., Савваитова К. А., Кузицин К. В., Груздева М. А., Павлов С. Д. 2007. Жизненные стратегии микижи *Parasalmo mykiss* и кумжи *Salmo trutta*, интродуцированных в водоёмы Чили // Вопр. ихтиологии. Т. 47. № 4. – С. 451–461.
- Савваитова К. А., Максимов В. А., Мина М. В., Новиков Г. Г., Кохменко Л. В., Мацук В. Е. 1973. Камчатские благородные лососи (систематика, экология, перспективы использования как объекта форелеводства и акклиматизации). – Воронеж: Воронеж. гос. ун-т. – 120 с.
- Zhivotovsky L. A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers // Molecular Ecology. Vol. 8. № 6. – P. 907–913.