

Шпигальская Нина Юрьевна

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ АЗИАТСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ
ТИХООКЕАНСКОГО ЛОСОСЯ – ЧАВЫЧИ, *ONCORHYNCHUS TSCHAWYTSCHA*
(WALBAUM)**

03.02.07 – генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петропавловск-Камчатский – 2010

Работа выполнена в лаборатории популяционной биологии и генетики Камчатского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (ФГУП «КамчатНИРО»)

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Варнавская Наталья Васильевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Балакирев Евгений Станиславович

кандидат биологических наук

Зеленина Дарья Александровна

Ведущая организация:

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Защита состоится « 4 » июня 2010 г. в « 11 » часов на заседании диссертационного совета Д.005.008.01 при Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон: (4232) 310-905, факс: (4232) 310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря им А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « 29 » апреля 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

Ващенко М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Тихоокеанские лососи рода *Oncorhynchus*, являясь ценными объектами промысла, имеют большое экономическое значение для стран Тихоокеанского бассейна. Для всех представителей рода характерна сложная популяционная организация, основными чертами которой являются соответствие принципу иерархии и упорядоченная во времени и пространстве субпопуляционная структура (Altukhov, 1971, 1981, 1990; Алтухов, 1973, 1974; Altukhov, Salmenkova, 1981, 1991; Алтухов и др., 1997; Altukhov et al., 2000). Эмпирическое подтверждение существования в пределах видов генетически отличающихся, репродуктивно изолированных единиц, дает основание для утверждения, что успех краткосрочной стратегии управления ресурсами и долговременных целей сохранения видов зависит от наличия, наряду с демографическими и экологическими данными, информации о генетической внутривидовой структуре (Алтухов и др., 1997; Алтухов и др., 2004). Для решения теоретических проблем популяционной организации в сочетании с долговременным мониторингом популяционных генофондов и прикладных задач генетической идентификации также необходимы данные о генетическом своеобразии внутривидовых структурных компонентов и оценки уровня их дифференциации.

Чавыча, *O. tshawytscha* (Walbaum), является одним из наиболее ценных видов тихоокеанских лососей, который в азиатской части ареала обитает преимущественно на Камчатке. Популяционно-генетические исследования чавычи Северной Америки, где данный вид распространен практически по всему тихоокеанскому побережью, были начаты во второй половине 20 в. и показали высокий уровень межпопуляционной изменчивости по аллозимным локусам (Kristiansson, McIntyre, 1976; Gharrett et al., 1987; Reisenbichler, Phelps, 1987; Beacham et al., 1989, 1996; Utter et al., 1989; Bartley, Gall, 1990; Gall et al., 1992; Crane et al., 1996; Teel, 2000, 2004; Templin, Seeb, 2003), структуре митохондриальной ДНК (Wilson et al., 1987; Cronin et al., 1993; Adams et al., 1994), микросателлитам (Moran et al., 2005; Beacham et al., 2006b; Seeb et al., 2007) и единичным нуклеотидным заменам (SNPs) (Smith et al., 2007; Narum et al., 2008). Были созданы объединенные реперные базы данных по частотам аллозимных локусов, на основе которых с успехом осуществлялась идентификация смешанных уловов в прибрежных водах США и Канады (Teel et al., 1999), и базы реперных данных по аллельной изменчивости микросателлитных локусов (Moran et al., 2005; Seeb et al., 2007). Частоты аллозимных генов служили также маркером для оценки успешности деятельности рыбоводных заводов (Waples, 1990a,b; Waples, Do, 1994).

В Азии исследования генетической структуры популяций чавычи на основе биохимической изменчивости и полиморфизма мтДНК находятся на начальном этапе, анализ микросателлитной ДНК и полиморфизма единичных нуклеотидных замен пока не начат.

До недавнего времени для выявления внутри- и межпопуляционной дифференциации и оценки биологического разнообразия азиатских популяций тихоокеанских лососей наиболее широко использовали такие маркеры генетической изменчивости, как полиморфные белковые локусы (Алтухов, 2003; Алтухов и др., 1997; Варнавская, 2001), но в последние десятилетия все большее значение приобретают исследования на уровне ДНК (Avice, 1994; Брыков, 2001; Чуриков, 2001; Алтухов, Салменкова, 2002). Внедрение молекулярно-генетических методов в популяционные исследования позволяет дополнить и расширить уже сформированную картину генетической подразделенности и процессов эволюции видов. Анализ изменчивости нуклеотидной последовательности может дать дополнительное количество высокоинформативных маркеров, что особенно актуально при исследовании видов со сложной генетической структурой и отсутствием четкой корреляции между генетическим и географическим расстояниями.

Исследования популяционной структуры тихоокеанских лососей с использованием молекулярно-генетических методов в силу их больших и принципиально новых возможностей получили в настоящее время широкое распространение. Анализ изменчивости неядерной наследственной структуры – митохондриальной ДНК является эффективным инструментом оценки генетической дивергенции и выявления филогенетической истории популяций (Полякова и др., 1992; Brykov et al., 1996; Брыков и др., 1999а,б; Брыков и др., 2002; Брыков и др., 2005). Исследования полиморфизма мтДНК чавычи могут дать дополнительную информацию о внутри- и межпопуляционной генетической структуре данного вида, позволят выявить филогенетические связи между внутривидовыми структурными единицами, а также увеличить число информативных генетических маркеров, пригодных для различных аспектов популяционных исследований.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является оценка уровня генетического разнообразия азиатских популяций чавычи на основе биохимического полиморфизма и гаплотипической изменчивости митохондриальной ДНК, а также создание баз генетических данных для последующей идентификации региональной принадлежности чавычи в смешанных морских скоплениях.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. изучить биохимический полиморфизм и изменчивость последовательностей мтДНК в популяциях чавычи азиатской части ареала;
2. выявить максимально возможное число информативных генетических маркеров в популяциях чавычи;
3. выделить набор наиболее дискриминирующих азиатскую чавычу генетических маркеров для идентификации ее в смешанных уловах;

4. оценить внутри- и межпопуляционную изменчивость генетической структуры чавычи Азии;

5. исследовать генетическую дивергенцию азиатских и североамериканских популяционных комплексов.

Научная новизна. Впервые получены результаты исследования полиморфизма митохондриальной ДНК у чавычи Камчатки. Анализ гаплотипической изменчивости позволил получить оценки внутри- и межпопуляционной дифференциации, а также уровня дивергенции популяций азиатской части ареала. Выявлено, что максимальное время независимой эволюции камчатских популяций чавычи соответствует оценке во временном интервале, не превышающем 10–20 тыс. лет. Впервые получены сравнительные оценки генетического разнообразия по аллозимным локусам чавычи различных частей ареала. Характер пространственной изменчивости аллельных частот, уровень внутри- и межпопуляционной дифференциации по исследованным аллозимным локусам позволил выделить ряд наиболее информативных для идентификации азиатских популяций чавычи в смешанных морских скоплениях.

Практическая значимость. Результаты, представленные в работе, могут быть использованы для создания баз реперных данных по двум типам исследованных генетических маркеров в целях идентификации смешанных морских скоплений чавычи, а также генетического мониторинга популяционных процессов и сохранения естественного биоразнообразия природных популяций данного вида в условиях морского и берегового промысла. Помимо этого, полученные результаты на практике могут быть использованы при организации искусственного разведения чавычи для долговременного слежения за состоянием популяционных генофондов, оценки и прогнозирования их динамики во времени и пространстве.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы были представлены на Международной конференции «Новые технологии в защите биоразнообразия в водных экосистемах» (Москва, 27–29 мая 2002 г.), Международной рабочей группе Северотихоокеанской комиссии по анадромным видам рыб NPAFC International Workshope on Application of Stock Identification in Defining Marine Distribution and Migration of Salmon (Honolulu, Hawaii, USA, November 1-2, 2003), объединенной отчетной сессии НТК «ТИНРО» (Петропавловск-Камчатский, 2006 г.), Международной конференции «Ихтиологические исследования на внутренних водоемах» (Саранск, 2007), X Всероссийском популяционном семинаре «Современное состояние и пути развития популяционной биологии» (Ижевск, 17–22 ноября 2008 г.), а также в виде научных годовых отчетов ФГУП «КамчатНИРО» в 2001 г. и 2003–2006 гг.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе, 1 статья – в рецензируемом журнале из списка ВАК.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, состоит из Введения, Обзора литературы (гл. 1), главы 2 «Материалы и методы», результатов и обсуждения (гл. 3 и 4), Заключение, Выводов, Списка литературы, включающего 212 ссылок, из которых 152 – на английском языке и 4-х Приложений. Работа иллюстрирована 23 рисунками и содержит 19 таблиц.

Благодарности. Автор искренне благодарит своего научного руководителя Наталью Васильевну Варнавскую за конструктивное руководство, создание творческой атмосферы и постоянный научный интерес. Автор выражает глубокую признательность заведующему лабораторией генетики Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН Владимиру Алексеевичу Брыкову за внимательное отношение, консультации и предоставленную возможность обработки материала, а также всему коллективу сотрудников, работающему под его руководством за помощь и поддержку в работе. Автор искренне признателен Р.А. Шапореvu за неоценимую помощь в статистической обработке данных и всем коллегам лаборатории популяционной биологии и генетики, а также сотрудникам КамчатНИРО, принимавшим участие в сборе материала в сложных условиях труднодоступных районов Камчатки.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В первом разделе обзора литературы приводится краткий очерк биологии чавычи (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum), рассматриваются различные аспекты внутривидовой организации данного вида тихоокеанских лососей.

Во втором разделе приводится описание результатов исследований популяционной структуры тихоокеанских лососей на основе молекулярно-генетических методов, оценивается состояние изученности данного вопроса у чавычи азиатской и североамериканской частей видового ареала.

Глава 2. Характеристика материала и методов исследования

Материал исследования

В работе для анализа изменчивости на основе биохимического полиморфизма было исследовано тринадцать выборок из семи популяций чавычи Камчатки (638 экз.); для анализа популяционной изменчивости на основе полиморфизма мтДНК – тринадцать выборок (579 экз.) чавычи из восьми локальных популяций Западной Камчатки и пяти,

включая бас. Олюторского залива, Восточной Камчатки. Объёмы выборок представлены в табл. 1, а их локализация – на рис. 1–2.

Таблица 1. Локализация сбора и объём выборок чавычи Камчатки и Северной Америки, исследованных при анализе биохимического полиморфизма

Регион	№	Локальность	Кол-во, экз.	Год
биохимический полиморфизм				
Северо-Западная Камчатка	1	р. Хайрюзова	40	1997
	2	р. Воровская	50	1994
	3	р. Воровская	50	1995
Западная Камчатка	4	р. Утка	42	1997
	5	р. Быстрая	50	1998
	6	р. Большая	50	1996
Юго-Восточная Камчатка	7	р. Большая	50	1998
	8	р. Авача	40	1997
Восточная Камчатка	9	р. Авача	40	1998
	10	р. Камчатка, поздняя	72	1997
Восточная Камчатка	11	р. Камчатка, ранняя	64	1995
	12	р. Камчатка, ранняя	50	1998
	13	р. Камчатка, поздняя	40	1998
полиморфизм мтДНК				
Северо-Западная Камчатка	1	р. Палана	50	2002
	2	р. Тигиль	42	2002
	3	р. Воровская	50	2003
Западная Камчатка	4	р. Коль	50	2003
	5	р. Пымта	50	2002
	6	р. Кихчик	33	2003
	7	р. Утка	50	2002
Юго-Восточная Камчатка	8	р. Большая	60	2002
	9	р. Авача	44	2003
Восточная Камчатка	10	р. Жупанова	30	2003
Северо-Восточная Камчатка	11	р. Камчатка	60	2003
Северо-Восточная Камчатка	12	Олюторский залив	50	2002
	13	р. Пахача	10	2001

Для анализа гаплотипической изменчивости тотальную ДНК выделяли из ткани сердечной мышцы стандартным способом с использованием метода протеиназного гидролиза в присутствии додецилсульфата натрия с последующим высаливанием белков, удалением их вместе с клеточными обломками центрифугированием и осаждением ДНК из супернатанта изопропанолом (Маниатис и др., 1984; Sambrook et al., 1989).

Изменчивость мтДНК исследовали, используя рестрикционный анализ трех фрагментов, которые амплифицировали посредством полимеразной цепной реакции с использованием праймерных последовательностей, разработанных на других видах лососей – микиже, *Oncorhynchus mykiss*, и кижуче, *Oncorhynchus kisutch* (Zardoya et al., 1995; Gharrett

Для генетической характеристики чавычи американской части ареала на основе аллозимной изменчивости использовали опубликованные ранее данные по частотам белковых локусов в популяциях Юго-Восточной и Западной Аляски, о-ва Кодьяк, п-ва Аляска (Crane et al., 1996), Орегона и Калифорнии (Gall et al., 1992). Объединенная база данных включает генетические характеристики 7843 экз. чавычи из 100 локальных популяций.

Молекулярно-генетические методы анализа. Основной метод выявления биохимической изменчивости, использованный в работе – электрофорез в крахмальном геле с последующим субстратспецифичным окрашиванием (Aebersold et al., 1987).

et al., 2001). Обозначение исследуемых в данной работе фрагментов и праймерные последовательности, использованные при амплификации, приведены в табл. 2.

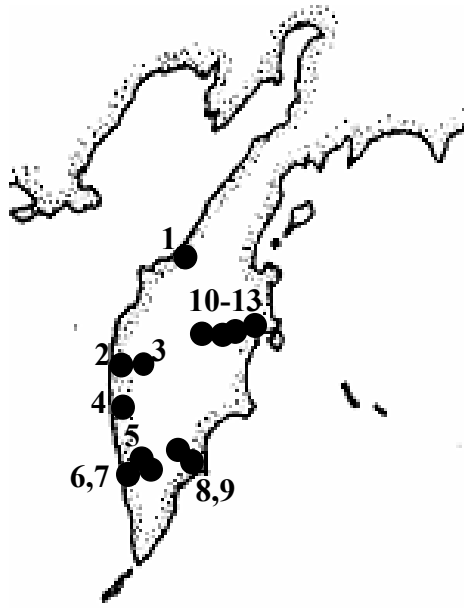


Рис. 1. Локализация сбора проб чавычи Камчатки, исследованных при анализе биохимического полиморфизма (1 – р. Хайрюзова, 2-3 – р. Воровская, 4 – р. Утка, 5 – р. Быстрая, 6-7 – р. Большая, 8-9 – р. Авача, 10-13 – р. Камчатка).

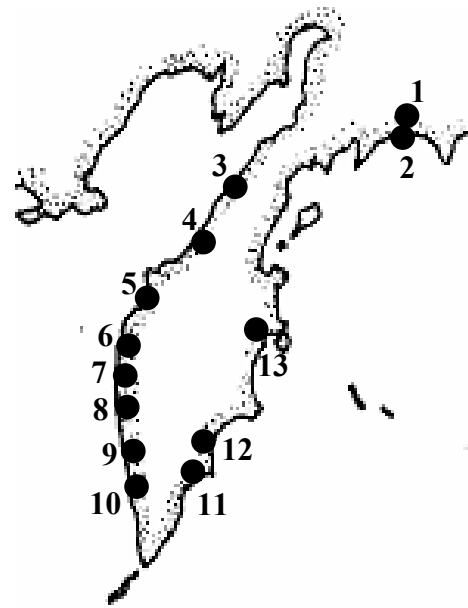


Рис. 2. Локализация сбора проб чавычи Камчатки, исследованных при анализе полиморфизма мтДНК (1 – р. Пахача, 2 – Олюторский залив, 3 – р. Палана, 4 – р. Тигиль, 5 – р. Воровская, 6 – р. Коль, 7 – р. Пымта, 8 – р. Кихчик, 9 – р. Утка, 10 – р. Большая, 11 – р. Авача, 12 – р. Жупанова, 13 – р. Камчатка).

Таблица 2. Последовательность праймеров и гены в соответствующих амплифицированных фрагментах мтДНК

Структурные гены	Последовательности
A8/A6/COIII/ND3	5'-СТАGТGACATGCCCCAACTCAACC-3' 5'-TCATAAGGCGGTCATGGACTTAAACC-3'
ND3/ND4L/ND4	5'-TTACGCGTATAAGTGA CTTC CAA-3' 5'-TTTTGGTTCCTAAGACCAATGGAT-3'
COI/COII/A8	5'-TAATCGTCACAGCCCATGCCTTCGT-3' 5'-GGTCAGTTTCAGGGTTCAGGTTTAGC-3'

Изменчивость нуклеотидной последовательности анализировали, используя набор рестриктных ферментов: *Bst*NI, *Hin*FI, *Mbo*I, *Rsa*I, *Dde*I, *Taq*I, *Msp*I, *Sau*96I.

После реакции эндонуклеазного гидролиза пробы подвергали электрофорезу в 1.8–2% агарозном геле в трис-боратном буфере. Для определения молекулярной массы образующихся фрагментов использовали маркерный набор фрагментов ДНК, кратных 100 парам оснований (BRL Gibco, Grand NY) и ДНК фага λ , обработанную рестриктазой *Pst*I. Фрагменты ДНК в геле окрашивали этидиумбромидом и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Методы статистического анализа. Для статистической обработки результатов биохимических исследований применяли стандартные методы анализа частот генотипов и аллелей (Ли, 1978). Критерий χ^2 и G-тест (G-критерий) (Sokal, Rolf, 1981) применяли для

оценки внутри- и межпопуляционной генетической гетерогенности локальных стад и региональных популяционных комплексов. Как мера количественных различий между популяциями вычислялись генетические расстояния с использованием хордового метода (Cavalli-Sforza, Edwards, 1967) и критерия идентичности М. Нея (Nei, 1987) с последующим построением UPGMA-дендрограмм (Sneath, Sokal, 1973). Другим подходом к оценке генетического сходства популяций был метод многомерного шкалирования (Kruskal, 1964).

Оценку количества замен оснований на нуклеотидный сайт и их стандартные отклонения между гаплотипами рассчитывали, используя пакет программ REAP (McElroy et al., 1992). Нуклеотидную дивергенцию между всеми парами гаплотипов определяли с помощью программы D, а дивергенцию между всеми парами популяций – с помощью программы DA (McElroy et al., 1992). Нуклеотидную и гаплотипическую величины разнообразия рассчитывали по М. Нею (Nei, Tajima, 1983; Nei, 1987) в пакетах программ REAP. Оценку величины дивергенции между выборками и их стандартные ошибки оценивали по М. Нею и Ч. Ли (Nei, Li, 1979). Полученная в REAP матрица количественных значений дивергенции между популяциями использовалась для кластерного анализа (программа UPGMA, пакет программ NTSYS) и построения фенотипов (Rolf, 1990). Для оценки значимости межпопуляционных различий частот гаплотипов использовали методы *F*-статистики в пакете программ Arlequin2000 (Schneider et al., 2000). Межпопуляционную гетерогенность оценивали с использованием псевдовероятностного теста (Zaykin, Pudovkin, 1993).

Глава 3. Биохимический полиморфизм в популяциях чавычи

Уровень изменчивости аллозимных популяционных маркеров. При анализе чавычи азиатской части ареала был определен уровень аллельной изменчивости 55 аллозимных генов. Доля полиморфных локусов составила меньше половины их общего числа – 20 (36.4%). Количество аллелей в подавляющем большинстве полиморфных локусов не превышало двух и в сумме составило 41. Только при анализе *GPIA** в камчатских популяциях было выявлено три аллельных варианта.

При объединении наших данных по аллельной изменчивости чавычи Азии с опубликованными ранее материалами по популяциям чавычи Северной Америки (Gharrett et al., 1987; Bartley, Gall, 1990; Bartley et al., 1992; Gall et al., 1992; Utter et al., 1992; Wilmot et al., 1992; Adams et al., 1994; Crane et al., 1996; Quinn et al., 1996) было выявлено, что количество полиморфных локусов оказалось равным 69 (73.4%) и значительно превысило данный показатель в выборках из азиатских популяций. Из общего числа мономорфных локусов (25) большая часть (20) у чавычи Камчатки исследована не была. Только пять локусов (*CKA1**

*FH**, *G3PDH1**, *LDHA2**, *LDHB1**) были определены как мономорфные во всех включенных в анализ выборках. Большинство локусов, мономорфных в Азии, оказались изменчивыми в выборках из локальных популяций Северной Америки.

Число аллелей полиморфных локусов в выборках на североамериканской части видового ареала чавычи варьировало от 2 до 7. Общее число аллелей у исследованных 7843 экз. чавычи составило 201, среднее число аллелей на локус оказалось равным 2.91.

Число полиморфных локусов в различных популяциях чавычи Камчатки менялось от 9 до 16, и, соответственно, диапазон варьирования был достаточно широким – от 16.4% до 29.1%. Этот факт согласуется с данными по североамериканским популяциям чавычи, где отмечен еще более широкий диапазон варьирования доли полиморфных локусов в отдельных популяциях (5.8–32.1%%) (Bartley, Gall, 1990).

Следует отметить, что некоторые аллозимные маркеры у азиатской чавычи являются полиморфными лишь в отдельных локальностях и фиксированы в остальных. Так, локус *GR** полиморфен только в выборке из р. Хайрюзова, локусы *LDHC** и *PEPD2** – в р. Большая, *TRIZ** – в р. Утка, а локус *mAATI** изменчив только в двух популяциях – р. Камчатка и р. Быстрая. Подобные особенности полиморфизма ферментных локусов отмечены и для чавычи американской части ареала (Gharrett et al., 1987; Utter et al., 1989; Bartley et al., 1992).

Для последующей оценки генетической изменчивости популяций и региональных комплексов азиатской чавычи было отобрано всего 16 полиморфных локусов, но и среди этого количества присутствовали локусы, частота основного аллеля которых в некоторых локальностях была равна 1.0.

Оценки генетического разнообразия, представленные в виде усредненной на локус гетерозиготности по аллозимным генам для разных регионов (H_t) и для отдельных популяций региона (H_s), а также оценки относительного межпопуляционного разнообразия G_{st} приведены в табл. 3. Показатель общего генного разнообразия региональных популяционных систем чавычи, (H_t), усредненный по всем исследованным выборкам и

Таблица 3. Оценки генетического разнообразия по аллозимным локусам у чавычи

Регион	Кол-во выборок	Число локусов (полиморфные)	H_t	H_s	G_{st} , %
п-ов Камчатка	13	47 (20)	0.0633	0.0615	2.9
Юго-Восточная Аляска	18	41 (28)	0.0764	0.0725	5.1
Западная Аляска	32	41 (29)	0.0533	0.0505	5.4
Нортон Саунд, шт. Орегон	6	53 (41)	0.1065	0.1012	5.0
Шт. Южный Орегон и Северная Калифорния	5	53 (45)	0.0858	0.0840	2.2
Бассейны р. Кламат и р. Тринити	10	53 (48)	0.0613	0.0577	5.9
Центральная Калифорния	11	53 (47)	0.0701	0.0681	2.8
Бассейн р. Сакраменто	5	53 (29)	0.0884	0.0870	1.6

по всей совокупности аллозимных локусов, оказался равен 0.0784, среднее значение величины G_{st} – 0.0922. Уровень межпопуляционного разнообразия чавычи Аляски и некоторых южных регионов Северной Америки несколько выше, чем у чавычи Камчатки. Используя собственные и ранее опубликованные данные, были сопоставлены величины генного разнообразия на разных уровнях внутривидовой иерархии (табл. 4).

Таблица 4. Подразделение генетической изменчивости в совокупности выборок из популяций чавычи Азии и Северной Америки (100 выборок, 53 аллозимных локуса; по нашим данным и по Gall et al., 1992; Crane et al., 1996)

Уровень иерархии	Абсолютное разнообразие	Относительное разнообразие, %
Общее, H_t	0.0829	100.00
Внутри выборок, H_s	0.0718	86.61
Между всеми выборками		13.39
Между регионами		9.05
Между популяциями в регионах		4.34

межпопуляционной дифференциации в пределах данных регионов.

В соответствии с распределениями частот аллелей были выявлены достаточно четко выраженные отличия групп популяций по большому числу аллозимных локусов. Так, можно отметить, что по локусам *sAAT1,2** и *mAAT1** аллель *100**, фиксирован почти на всем ареале кроме Северной Калифорнии и Орегона, а также Юго-Восточной Аляски. По локусу *PEPLT** наиболее изменчивы популяции Юго-Восточной Аляски и Западной Аляски. По локусу *sAH1** все регионы изменчивы, кроме Западной Аляски и Центральной Калифорнии, где этот локус почти фиксирован. По локусу *GPIB2** изменчивы популяции Калифорнии и Орегона, во всех остальных частях ареала он почти мономорфен. Локус *IDDH1** является наиболее дискриминирующим для популяций Азии: в большинстве популяций Северной Америки он мономорфен, но высокополиморфен как в популяциях Западной, так и Восточной Камчатки. Локусы *PEPD2**, *sMDHB1,2**, *sMEP2**, *PEPA**, *PEPB1**, *sIDHP2** также мономорфны в одних регионах и полиморфны в других. Локусы *TPI4** и *sAAT3** являются дифференцирующими для популяций Калифорнии, *sMEP1** – для популяций Западной и Северной Аляски, а также Азии, *PGK2** – для популяций Азии и Аляски, *sIDHP1**, *FGDH** – для популяций Юго-Восточной Аляски. Таким образом, на основе выраженной аллельной изменчивости отдельных аллозимных локусов, имеет место значительная дифференциация региональных популяционных групп чавычи.

Ранее, в связи с наблюдаемыми закономерностями распределения аллельных частот на ареалах тихоокеанских лососей, Н.В. Варнавской все гены были условно разделены на четыре типа: I – гены, высокополиморфные на всем ареале, II – гены, мономорфные или почти мономорфные в одних регионах и высокополиморфные в других, III – гены,

Как видно из приведенных оценок G_{st} (%), дифференциация региональных групп популяций (соответствуют табл. 3) заметно выше уровня

мономорфные на всем ареале и низкополиморфные в отдельных регионах, IV – гены, почти мономорфные на всем ареале с появляющимися иногда в разных регионах редкими аллелями (Варнавская, 2005, 2006). У чавычи, на основании проанализированных в настоящем исследовании данных, к первому типу можно отнести только один локус – *MPI**. Остальные являются мономорфными хотя бы в одном из исследованных регионов.

Ко второму, наиболее дискриминирующему региональные группы популяций типу, были отнесены 17 локусов (табл. 5), причем уровень изменчивости по многим из них очень велик: на протяжении ареала происходит замена доминирующего аллеля на альтернативный (частота изменяется от 1.0 почти до 0.0). Такая картина характерна для локусов *sMEP1**, *PGK2**, *IDDH1**, *PEPA**. Локус *ADA1**, являясь мономорфным в популяциях чавычи шт. Орегон и Калифорния, имеет высокий уровень полиморфизма на Аляске и Камчатке. Сходная картина наблюдается по локусам *sAAT3**, *TPI4**, *IDDH1**, *mMDH2**. Локусы *PEPA**, *GPIB2**, *sSOD1**, *sMEP1**, *PGK2**, напротив, высокополиморфны в южных районах американской части ареала и мономорфны, или почти мономорфны, в Азии и значительном числе локальностей Аляски.

К третьему типу у чавычи были отнесены еще 11 локусов, для которых характерен четко ограниченный региональными рамками полиморфизм, хотя и с невысокими (0.00–0.15) частотами редких аллелей. Особенным своеобразием отличаются южные локальные стада Североамериканского континента и относительно небольшая часть популяций Аляски.

Степень изменчивости полиморфных аллозимных генов, условно отнесенных к разным типам в зависимости от распределения их аллельных частот на ареале, отражена в величинах полокусной внутри- и межпопуляционной изменчивости (H_s и F_{st} , соответственно) (табл. 5). Как видно из представленных данных, уровень дифференциации наиболее значителен по локусам, условно отнесенным ко второй группе генов, для которых характерен наиболее широкий диапазон варьирования частоты основного аллеля и достаточно четко выраженная межрегиональная изменчивость.

Таким образом, в представленной работе у чавычи было выявлено около 30 высокоинформативных, с точки зрения анализа популяционной структуры, аллозимных локусов. Можно подчеркнуть, что наиболее дискриминирующими внутри азиатской части ареала являются 10 локусов – *sAH1**, *sIDHP2**, *mMDH2**, *MPI**, *TPI4**, *sMEP1**, *sMEP2**, *ALAT**, *mSOD1** и *GPIA** (по трем последним локусам нет данных по аллельной изменчивости в локальностях Орегона и Калифорнии); Азию и Северную Америку хорошо дифференцируют 23 локуса – *mAAT1**, *mAAT2**, *sAAT1,2**, *sAAT3**, *ADA1**, *sAH1**, *GPIB2**, *IDDH1**, *sIDHP1**, *sIDHP2**, *mMDH2**, *sMDHB1,2**, *sMEP1**, *sMEP2**, *MPI**, *PEPLT**, *PEPA**, *PEPB1**, *PEPD2**, *PGK2**, *PGM2**, *sSOD1**, *TPI4**. Следует отметить сравнительно высокий

Таблица 5. Оценка средней популяционной гетерозиготности (H_s) и уровня межпопуляционной дифференциации F_{st} (%) по 29 полиморфным локусам чавычи Азии и Северной Америки.

Тип изменчивости	Локус	H_s	F_{st}
I	<i>MPI*</i>	0.247	11.0
II	<i>sAAT3*</i>	0.131	10.5
II	<i>sAAT4*</i>	0.118	14.9
II	<i>ADA1*</i>	0.122	11.0
II	<i>sAH1*</i>	0.114	6.3
II	<i>GPIB2*</i>	0.146	33.0
II	<i>IDDH1*</i>	0.141	24.2
II	<i>sIDHP1*</i>	0.059	12.2
II	<i>sIDHP2*</i>	0.090	7.7
II	<i>sMEP1*</i>	0.239	30.9
II	<i>sMEP2*</i>	0.129	15.0
II	<i>mMDH2*</i>	0.091	35.8
II	<i>PEPA*</i>	0.109	12.4
II	<i>PEPB1*</i>	0.084	6.4
II	<i>PGK2*</i>	0.206	27.5
II	<i>sSOD1*</i>	0.186	11.2
II	<i>TPI3*</i>	0.066	9.9
II	<i>TPI4*</i>	0.092	9.6
III	<i>sAAT1,2*</i>	0.013	5.4
III	<i>mAAT1*</i>	0.012	3.0
III	<i>mAAT2*</i>	0.023	4.8
III	<i>ESTD*</i>	0.012	1.2
III	<i>FBALD3*</i>	0.012	1.2
III	<i>FGDH*</i>	0.010	6.2
III	<i>LDHC*</i>	0.002	1.2
III	<i>sMDHB1,2*</i>	0.003	7.1
III	<i>PEPLT*</i>	0.021	4.7
III	<i>PEPD2*</i>	0.007	3.1
III	<i>PGM2*</i>	0.015	6.4

Частоту основного аллеля аллозимных локусов, исследованных в каждой популяции, сопоставляли с географической широтой устья соответствующего речного бассейна, после чего вычисляли коэффициенты корреляции и оценивали их достоверность.

Результаты анализа показали, что частота основного аллеля большинства высокополиморфных локусов, условно отнесенных в зависимости от типа географической изменчивости аллельных частот к II группе, достоверно коррелирует с географической широтой устья нерестовых рек. Исключением являются локусы *sAH1**, *sMEP2**, *PEPB1**. Для III группы аллозимов оказались характерны относительно более низкие значения коэффициентов корреляции, хотя достоверность связи была также подтверждена в большинстве случаев (кроме локусов *mAAT1**, *mAAT2**, *FGDH**, *PEPD2**). Из числа локусов,

уровень полиморфизма по аллозимным локусам у чавычи относительно других исследованных ранее видов тихоокеанских лососей (Kobayashi et al., 1984; Shaklee et al., 1990b,c; Варнавская, 2005).

Клиальная изменчивость частот аллозимных локусов. Ранее при исследовании биохимического полиморфизма у разных видов рыб было отмечено, что частоты аллелей ряда аллозимных локусов закономерно меняются по мере продвижения по территории, занимаемой видом (Кирпичников, 1987). Данное явление, при котором происходит постепенное изменение генных частот или других признаков в широтном (или в каком-либо другом) направлении, принято называть клиальной изменчивостью. Обнаружение клиальной изменчивости, оценка направления и характерных свойств географических клин может способствовать выявлению функциональных особенностей аллозимов, а также дать информацию о характере расселения исследуемых видов и о механизмах формирования их современной популяционной структуры.

не исследованных в Азии, было выявлено еще шесть, аллельные частоты которых достоверно коррелировали с широтой на Северо-Американском континенте.

В целом у чавычи обнаружено 28 локусов, географическая изменчивость которых имеет характер клинальной, что, вероятно, отражает особенности миграционных потоков в период колонизации современных речных систем в период отступления ледников после Плейстоценового оледенения. При исследовании географических клин по биохимическим локусам у других видов рыб были описаны различные механизмы их появления (Кирпичников, 1987), но главной причиной возникновения определен отбор (Аронштам и др., 1977), т.е. клина, в широком понимании этого явления, – это ответ вида на различия в среде обитания в разных участках занятого им ареала.

Внутри- и межпопуляционная генетическая гетерогенность чавычи Азии.
Сезонная изменчивость. Во многих нерестовых водоемах у чавычи была выявлена временная гетерогенность нереста, т.е. весенняя, летняя и осенняя расы (Вронский, 1983, 1984; Горшков и др., 1985; Burger et al., 1985). Известно, что для анадромных лососей характерна сильная генетическая детерминированность времени возврата на нерест, маркируемая аллозимными различиями между сезонными расами (Алтухов, 1997). Для чавычи Америки установлено, что темпоральная (или межрасовая) генетическая дифференциация невелика – она составляет 7.3% всей межпопуляционной компоненты генетического разнообразия (Utter et al., 1989; Алтухов, 1997).

Внутрипопуляционная генетическая гетерогенность в настоящей работе оценивалась на примере чавычи р. Камчатка. Уровень гетерогенности оценивали для ранней и поздней рас чавычи 1998 г. (что соответствует по общепринятой градации весенней и летней расам), а также для объединенных выборок 1995 и 1998 гг. (ранняя раса) и 1997, 1998 гг. (поздняя раса). Выявлено только два локуса (*sSOD1** и *sMEP2**), гетерогенность по которым значима для исследованных выборок ($p < 0.05$). Суммарные значения G-теста и теста χ^2 оказались недостоверны. В целом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии достоверных генетических различий между темпорально изолированными группировками чавычи данной локальности.

Межгодовая изменчивость. Межгодовая изменчивость изучалась на примере чавычи двух популяций – р. Большая и р. Камчатка. Величины теста χ^2 и G-теста, оценивающих межвыборочную гетерогенность генотипических распределений, показали, что для р. Большая статистически значимый результат отмечен только по локусу *TPI4**. Оценки суммарной генетической гетерогенности между выборками 1996 и 1998 гг. (ранняя раса) показали ее недостоверность.

Анализ межгодовой изменчивости чавычи р. Камчатка показал однородность выборок 1997 и 1998 гг. (поздняя раса) и наличие значимой гетерогенности по локусам *sIDHP2**, *mSOD1**, *sMEP1** и *PEPA** для выборок 1995 и 1998 гг. (ранняя раса). Для второго случая суммарный результат теста χ^2 был недостоверен, а результат более чувствительного G-теста был значимым – 38.08 ($d.f. = 17, p < 0.01$).

Кроме того, оценка генетической гетерогенности для всех четырех выборок из р. Камчатка позволила выявить значимые различия только по трем локусам – *sIDHP2**, *mSOD1** и *sMEP1**. Суммарный результат показал отсутствие достоверных внутривнутрипопуляционных различий при использовании теста χ^2 – 58.73 ($d.f. = 43, p > 0.05$) и статистически достоверные различия при использовании G-теста – 65.41 ($d.f. = 43, p < 0.05$), причем как в первом, так и во втором случаях результаты находились на границе уровня значимости.

Таким образом, полученные нами оценки генетической гетерогенности популяции чавычи р. Камчатка не позволяют сделать окончательный вывод о наличии межгодовой изменчивости, оставляя этот вопрос открытым и требующим дальнейшего изучения. Можно предположить, что исследования 1995 и 1998 гг. были проведены на выборках из разных субпопуляций чавычи, мигрирующих на нерест в р. Камчатка, и показатели межгодовой изменчивости в данном случае могут отражать пространственную неоднородность данной речной системы.

Межпопуляционная гетерогенность. Межпопуляционная гетерогенность по 16 полиморфным генам оценивалась для чавычи всех исследуемых азиатских популяций и на примере только двух самых крупных стад – рр. Большая и Камчатка. И в первом, и во втором случаях в анализ были включены суммарные выборки из каждой локальной популяции. Оценки генетической гетерогенности выборок, выполненные с помощью критерия χ^2 и G-теста, оказались сходными.

Гетерогенность всех исследованных камчатских выборок была достоверной по частотам 10 генов – *ALAT**, *sAH1**, *sIDHP2**, *mMDH2**, *MPI**, *mSOD1**, *TPI4**, *sMEP1**, *sMEP2**, *GPIA**. Суммарные оценки гетерогенности по всем полиморфным локусам были высокодостоверными ($p < 0.001$), что говорит о значительной репродуктивной изоляции исследованных популяций.

Сравнение двух самых крупных популяций чавычи Азии – рек Большая и Камчатка показало их достоверную генетическую неоднородность. Межпопуляционные различия выявлены по 8-ми полиморфным локусам: *ALAT**, *sAH1**, *IDDH1**, *sIDHP2**, *MPI**, *sMEP1**, *sMEP2**, *GPIA**.

Региональная изменчивость азиатской чавычи. Для оценки региональной изменчивости использовали два варианта анализа. В первом из них региональная генетическая гетерогенность оценивалась для четырех групп локальных популяций – выборки из рек Северо-Западной Камчатки (рр. Хайрюзова и Воровская), Западной Камчатки (рр. Утка, Быстрая и Большая), Юго-Восточной (р. Авача) и Восточной Камчатки (р. Камчатка). Во втором варианте исследования проводили, выделив всего два региона – Восточная и Западная Камчатка.

Для четырех региональных групп выявлены достоверные отличия по большинству исследованных локусов. Суммарные результаты тестов показали генетическую гетерогенность этих популяционных систем на уровне значимости $p < 0.001$. Аналогичные результаты получены и для второго варианта анализа. Региональные популяционные комплексы Западной и Восточной Камчатки достоверно отличались по 8 из 16, включенных в анализ локусов (*ALAT**, *sAH1**, *IDDH1**, *sIDHP2**, *MPI**, *sMEP1**, *sMEP2**, *GPIA**). Суммарные отличия между выборками этих регионов были достоверны также на уровне $p < 0.001$. Таким образом, можно отметить, что уровень генетической дифференциации близко соответствует географической подразделенности региональных групп популяций.

Оценка генетических расстояний между камчатскими популяциями чавычи. В результате проведенных исследований была создана база данных на основе аллозимной изменчивости, включающая частоты аллелей 10 выборок из 7 локальных популяций чавычи Камчатки. Вычисленные попарные стандартные генетические расстояния методом Нея (Nei, 1987) и генетические расстояния в соответствии с хордовым методом (Cavally-Sforza, Edwards, 1967) далее были исследованы методами кластерного анализа и многофакторного шкалирования.

Кластерный анализ стандартных генетических расстояний Нея (рис. 3) показал, что весь массив данных разделился на хорошо обособленные кластеры: Восточная Камчатка, центральная Западная Камчатка (р. Утка и р. Воровская), и Западная Камчатка (р. Большая и р. Хайрюзова). Сходная дендрограмма была получена при вычислении хордовых расстояний (рис. 4), но в данном случае наблюдается более выраженная дифференциация выборок из популяций Западной и Восточной Камчатки.

Вычисления расположения точек в системе трехмерных координат по методу многомерного шкалирования позволили получить ещё более четкую картину генетических отношений между исследуемыми популяциями (рис. 5). Точки, соответствующие выборкам из локальных стад крупных речных бассейнов (рр. Камчатка и Большая), легли близко друг к другу, тогда как точки, соответствующие более северным рекам Западной Камчатки, образовали обособленную, но более разреженную область. Ближе всех к выборкам р.

Большая оказалась выборка из р. Утка, затем р. Воровская и р. Хайрюзова, что соответствует их географическому расположению по отношению друг к другу.

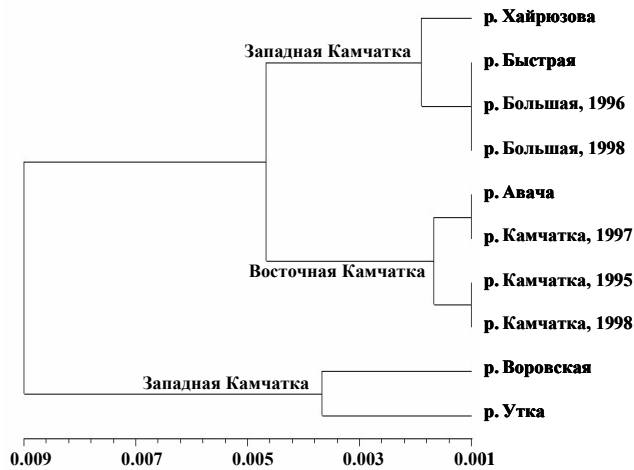


Рис. 3. UPGMA-дендрограмма, построенная на основе стандартных генетических расстояний (Nei, 1987), вычисленных по 20 полиморфным аллозимным локусам в популяциях чавычи Камчатки (*sAAT3**, *mAAT1**, *ADA1**, *ALAT**, *sAH1**, *mMDH2**, *GPIA**, *GR**, *IDDH1**, *sIDHP2**, *LDHC**, *sMEP1**, *sMEP2**, *MPI**, *PEPA**, *PEPD2**, *mSOD1**, *sSOD1**, *TPI3**, *TPI4**).

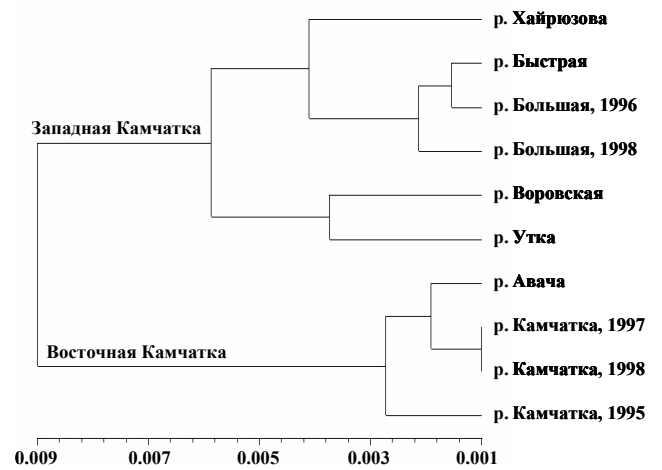


Рис. 4. UPGMA-дендрограмма, построенная на основе хордовых генетических расстояний (Cavally-Sforsa, Edwards, 1967), вычисленных по 20 полиморфным аллозимным локусам в популяциях чавычи Камчатки (набор локусов тот же, что указан для рис. 3.).



Рис. 5. Генетическое сходство популяций чавычи, вычисленное методом главных компонент по 20 полиморфным аллозимным локусам (набор локусов тот же, что указан для рис. 3.).

Генетическая дифференциация чавычи Азии и Северной Америки. Для оценки уровня дивергенции популяций чавычи в различных регионах ареала вида вычисляли генетические расстояния хордовым методом Кавалли-Сфорца (Cavally-Sforsa, Edwards, 1967). Результаты кластеризации показали, что весь массив данных разделился на две дифференцированных ветви – южные и северные популяции. Южная ветвь включает популяции Калифорнии и Орегона. Северная ветвь включает три обособленных кластера – Центральная и Западная Аляска, Юго-Восточная Аляска и Камчатка. Кластер камчатских

популяций разделился, в свою очередь, на два кластера – Восточная и Западная Камчатка. В целом, группы популяций, выделенные на основе генетических расстояний, соответствуют географическим региональным группам.

Анализ генетического сходства методом факторного шкалирования позволил выделить семь хорошо обособленных областей, которые полностью соответствуют региональным группам популяций – 1) бас. р. Сакраменто, 2) бас. рек Кламат и Тринити, 3) Калифорния и Орегон, 4) Юго-Восточная Аляска, 5) Центральная и Северо-Западная Аляска, 6) п-ов Камчатка (рис. 6).

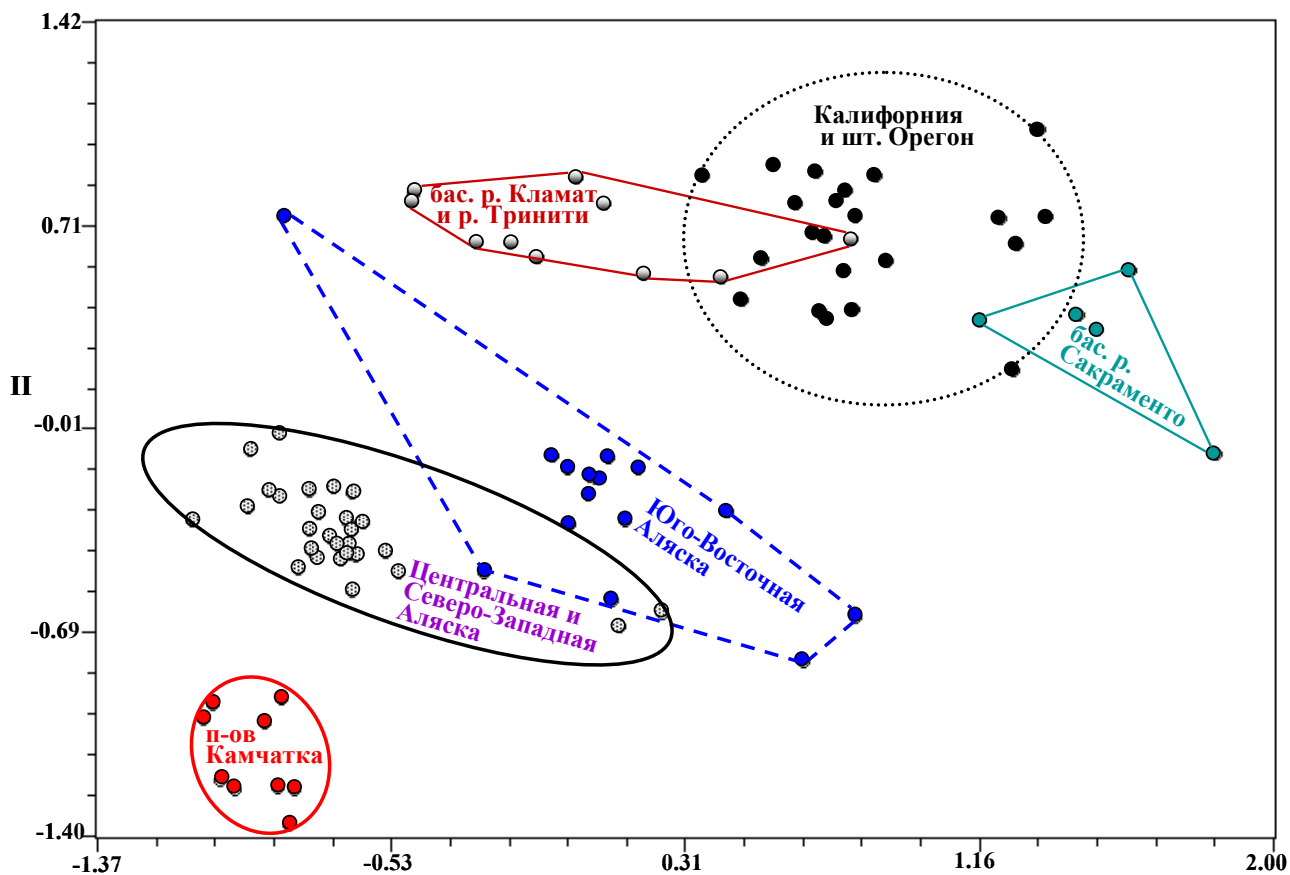


Рис. 6. Генетическое сходство популяций чавычи Азии и Северной Америки, вычисленное методом главных компонент по аллельным частотам 23 локусов.

На основе проделанного анализа был сформирован набор наиболее информативных дискриминирующих генов и созданы базы реперных данных, которые были использованы для идентификации смешанных уловов чавычи в Тихом океане и сопредельных морях (Varnavskaya et al., 2003; Varnavskaya, Shpigalskaya, 2004).

Глава 4. Изменчивость митохондриальной ДНК в популяциях чавычи Камчатки

Длина амплифицированных в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР) фрагментов мтДНК в сумме составляет почти 7000 пар нуклеотидов (пн), или около 40% всего митохондриального генома чавычи (Wilhelm et al., 2003). В результате ПДРФ-анализа

было выявлено 53 рестриктных сайта ($\approx 1.5\%$ митохондриального генома), из которых только 6 оказались полиморфными.

Объединённые данные, полученные в результате анализа трёх фрагментов мтДНК по всем сайтам рестрикции и использованным эндонуклеазам, позволили выявить 11 комбинированных гаплотипов у 579 особей чавычи Камчатки, обозначенные как G1–G11 (табл. 6). Как явно доминирующий может быть охарактеризован гаплотип G1, средняя частота других невелика и только в одном случае (G2) достигала значения 0.03.

Таблица 6. Выявленные комбинированные гаплотипы митохондриальной ДНК чавычи Азии

Комбини- рованный гаплотип	A8/COIII				ND3/ND4		COI/COII			
	<i>Bst</i> NI	<i>Hinf</i> I	<i>Mbo</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 96I	<i>Msp</i> I
G1	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A
G2	A	B	B	A	A	A	A	A	B	A
G3	B	B	B	A	B	A	A	A	A	A
G4	A	B	B	B	A	B	A	A	A	A
G5	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A
G6	A	B	B	A	A	B	A	A	A	A
G7	B	B	B	B	A	B	A	A	A	A
G8	B	B	B	A	A	A	A	A	B	A
G9	A	B	B	A	A	A	A	A	A	A
G10	B	B	B	A	A	B	A	A	A	A
G11	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A

Сеть гаплотипов, построенная по принципу минимального числа нуклеотидных различий между ними, приведена на рис. 7. Из рисунка видно, что распределение гаплотипов чавычи всех исследованных локальностей, в целом формирует картину «звёздчатой» радиации гаплотипов в результате, как правило, единичных нуклеотидных замен. Такое распределение свидетельствует об общности происхождения исследованных популяций и, соответственно, о едином предковом генофонде.

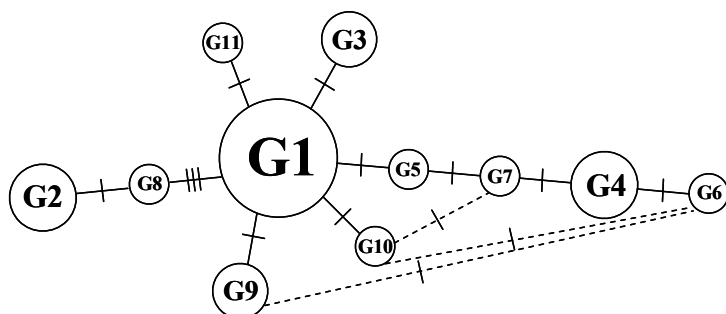


Рис. 7. Генеалогическая сеть гаплотипов чавычи Камчатки, построенная по принципу минимального числа нуклеотидных замен и показывающая мутационные различия между гаплотипами. Размер окружности приблизительно отражает частоту встречаемости данного гаплотипа во всех исследованных популяциях. Число поперечных штрихов на ветвях обозначает число нуклеотидных замен. Пунктиром обозначены вероятные альтернативные связи между гаплотипами.

Кроме того, «звездчатая» структура гаплотипической сети свидетельствует о недавнем происхождении популяций на исследованной части ареала (Rogers, Harpending,

1992; Rogers, 1995). Наличие возможных альтернативных связей между гаплотипами (петлевые структуры в сетке) может быть результатом гомоплазии, т.е. повторных и обратных мутаций в мтДНК (Churikov et al., 2001) с достаточной вероятностью происходящих на значительной части видового ареала.

Внутри- и межпопуляционная изменчивость частот гаплотипов мтДНК чавычи.

Частота встречаемости комбинированных гаплотипов, выявленных в популяциях чавычи, приведена в табл.7.

Таблица 7. Встречаемость комбинированных гаплотипов митохондриальной ДНК чавычи

Локальность	N	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
р. Палана	50	42	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
р. Тигиль	42	38	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0
р. Пымта	50	37	0	4	1	4	4	0	0	0	0	0
р. Утка	50	41	2	2	5	0	0	0	0	0	0	0
Олюторский залив	50	42	0	0	2	0	0	3	0	3	0	0
р. Коль	50	49	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
р. Воровская	50	48	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
р. Кихчик	33	32	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
р. Авача	44	43	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
р. Жупанова	30	29	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
р. Камчатка	60	52	5	0	0	0	0	0	0	0	3	0
р. Большая	60	49	2	4	2	0	2	1	0	0	0	0
р. Пахача	10	7	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
Всего	579	509	17	14	12	4	7	4	2	6	3	1

Доминирующий гаплотип G1 представлен во всех азиатских популяциях. В 13 исследованных выборках его частота варьировала от 0.70 (р. Пахача) до 0.98 (р. Коль), средняя частота составила 0.88. В шести камчатских популяциях отмечен гаплотип G4. Шесть гаплотипов (G2, G3, G6, G7, G8, G9) с низкой частотой присутствовали в меньшем количестве локальных популяций. Гаплотипы G5, G10, G11 обнаружены только в одной из 13 выборок, причем последний был выявлен у одной из исследованных особей. Вероятно, об указанных гаплотипах можно говорить как об уникальных, хотя в данном случае необходимо учитывать относительно небольшие объёмы исследованных выборок камчатской чавычи. Редкие гаплотипы, являясь дискриминирующими, могут служить молекулярными маркерами для особей соответствующих локальностей, что определяет необходимость продолжения и расширения поисковых исследований в данной области.

Значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия в популяциях камчатской чавычи приведены в табл. 8. На азиатской части ареала наиболее высокие значения данных показателей характерны для чавычи самой северной восточнокамчатской популяции – р. Пахача, несколько ниже эти значения у особей в выборках из рек Пымта, Большая и Утка. Как было отмечено ранее, в выборках из первых двух популяций присутствуют редкие

гаплотипы. Для всех остальных локальностей свойственны заметно более низкие величины гаплотипической и нуклеотидной изменчивости.

Таблица 8. Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие в популяциях чавычи

Популяция	Гаплотипическое разнообразие	Нуклеотидное разнообразие	Анализ количества нуклеотидных замен во всех гаплотипических вариантах при попарном сравнении популяций чавычи Камчатки позволил выявить максимальное число нуклеотидных замен – девять – в выборке из р. Большая, минимальное – одна нуклеотидная замена между двумя выявленными гаплотипами – у чавычи рек
р. Пахача	0.5333 ± 0.18007	0.002454	
Олюторский залив	0.2914 ± 0.08160	0.001430	
р. Палана	0.2743 ± 0.07093	0.002867	
р. Тигиль	0.1800 ± 0.07676	0.000712	
р. Воровская	0.0792 ± 0.05213	0.000303	
р. Коль	0.0400 ± 0.03803	0.000310	
р. Пымта	0.4416 ± 0.08286	0.001796	
р. Кихчик	0.0606 ± 0.05612	0.000152	
р. Утка	0.3208 ± 0.08147	0.002400	
р. Большая	0.3305 ± 0.07737	0.001958	
р. Авача	0.0455 ± 0.04292	0.000117	
р. Жупанова	0.0667 ± 0.06125	0.000517	
р. Камчатка	0.2435 ± 0.07001	0.001873	

Кихчик и Авача.

Ранее было показано, что в изолированных популяциях или группах локальных популяций конфигурация распределения числа нуклеотидных замен определяется демографической историей (Rogers, Harpending, 1992; Rogers, 1995). Размер выборок, использованных в нашем анализе, недостаточен для подобных заключений, но позволяет сделать первичную оценку эволюционного разнообразия. В соответствии с вышеизложенным, количество нуклеотидных замен в митохондриальных гаплотипах камчатских популяций чавычи варьирует от преимущественно одной до девяти, что позволяет говорить об очень небольшом эволюционном разнообразии азиатских популяций и о небольшой глубине дивергенции между ними.

Оценка географической гетерогенности частот гаплотипов. Частоты и варианты гаплотипов в исследованных выборках заметно различались. Среди особей из р. Большая удалось выявить наибольшее количество гаплотипов – шесть, в остальных популяциях азиатской части ареала их количество варьировало от двух (рр. Авача, Жупанова, Палана, Коль, Кихчик) до пяти (р. Пымта).

Анализ частот гаплотипов с использованием псевдовероятностного теста на гомогенность позволил оценить уровень неоднородности чавычи исследованных популяций. При сравнении всех 13 выборок п-ова Камчатка тест показал значимые различия ($\chi^2=314.62$; $d.f.=120$; $p<0.001$). При раздельном анализе гетерогенности региональных групп популяций Западной и Восточной Камчатки значения χ^2 -теста также оказались статистически

значимыми. Для восьми западнокамчатских популяций $\chi^2=125.88$ ($d.f.=56$, $p<0.001$), для пяти локальностей Восточной Камчатки – $\chi^2=66.91$ ($d.f.=28$, $p<0.001$). Вероятность гомогенности сравниваемых выборок при всех вариантах анализа оказалась равна нулю.

В результате применения методов *F*-статистики для оценки уровня генетической дифференциации азиатских популяций чавычи (оценка проводилась на основе изменчивости числа нуклеотидных замен) было выявлено, что между большинством сравниваемых пар значимые различия отсутствуют. На азиатской части ареала пять выборок (рр. Палана, Пымта, Коль, Воровская, Авача) при попарном сравнении значимо отличаются более чем от половины включенных в анализ локальностей.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на достоверный уровень гетерогенности чавычи на изучаемой части ареала по структуре мтДНК, межпопуляционная дивергенция в целом невелика даже с учётом того, что в отдельных случаях величина выраженности отличий между популяциями достигает значимого уровня.

Популяционная дивергенция чавычи на основе анализа изменчивости мтДНК.

Расчет матрицы дивергенции по нуклеотидным последовательностям между популяциями чавычи Камчатки позволил выявить, что максимальное значение различий (около 0.02% нуклеотидных замен) имеет место между выборкой из р. Палана и остальными. Фенограмма на основе матрицы представлена на рис. 8.

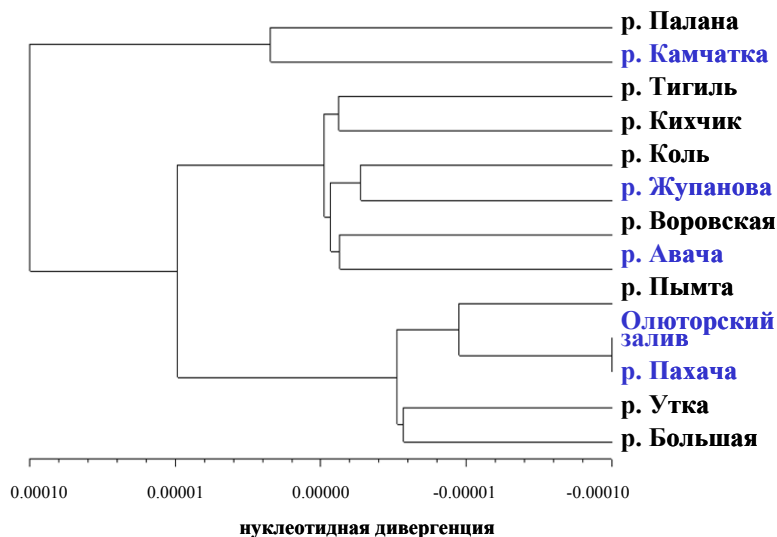


Рис. 8. UPGMA-фенограмма, иллюстрирующая генетические различия между локальными популяциями чавычи Камчатки.

Камчатские популяции, в соответствии с уровнем нуклеотидной дивергенции, сформировали три кластера, каждый из которых включает выборки, имеющие относительно близкие значения данного показателя. В наиболее дифференцированный кластер вошли популяции рек Палана и Камчатка. Кластер с несколько меньшими генетическими расстояниями между образовавшими его выборками, включает популяции рек Тигиль,

Кихчик, Коль, Жупанова, Воровская и Авача. В третьем кластере объединены популяции, нуклеотидная дивергенция между которыми оказалась минимальной – pp. Большая, Утка, Пымта, а также выборки из Олюторского залива. Необходимо отметить, что кластеризация популяций на дендрограмме не показывает четкой картины дифференциации популяций чавычи Западной и Восточной Камчатки.

Полученные данные были проанализированы также с использованием программы AMOVA (Analysis of Molecular Variance) в пакете программ Arlequin2000. В первом варианте анализировали всю совокупность выборок. Расчеты показали, что на долю внутривнутрипопуляционной генетической дисперсии приходится 95.98%, на долю межпопуляционной – 4.02%. В другом варианте расчета популяции объединяли в две группы в соответствии с географической принадлежностью – Западная Камчатка и Восточная Камчатка. При таком объединении выявляется близкая к нулю величина изменчивости, приходящаяся на межгрупповую компоненту. Доля межпопуляционной дисперсии внутри групп составляет 3.95%, а доля внутривнутрипопуляционной изменчивости (96.01%) незначительно увеличивается по сравнению с предыдущим вариантом анализа.

Вероятной причиной неглубокой дивергенции камчатских популяций чавычи по структуре мтДНК может являться их исторически недавнее происхождение в сочетании с относительно более низкой, чем у других тихоокеанских лососей, скоростью смены генераций, обратная зависимость между которой и уровнем изменчивости мтДНК других видов лососей была показана ранее (Брыков, 2001). Недавнее происхождение большинства популяций чавычи в реках Камчатки подтверждается также «звездчатой» структурой сети мтДНК. Можно предположить, что относительно небольшая глубина межпопуляционной дивергенции свидетельствует о независимой эволюции камчатских популяций в течение исторически небольшого временного периода, что подтверждается также низкой (менее 5%) долей генетической изменчивости, приходящейся на межпопуляционную компоненту. Если принять во внимание существующие оценки скорости накопления нуклеотидных замен в мтДНК наземных позвоночных – 2% замен нуклеотидов в течение 1 млн. лет (Avis, 1994; Avis et al. 1998), и допустить, что у тихоокеанских лососей приблизительная калибровка «молекулярных часов» соответствует еще меньшей скорости дивергенции пары нуклеотидных последовательностей, равной 1% за 1 млн. лет (Smith, 1992), то с учетом того, что выявленная величина различий между популяциями камчатской чавычи составляет около 0.02%, максимальное время дивергенции соответствует оценке во временном интервале, не превышающем 10–20 тыс. лет. Вероятно, отступление позднеплейстоценового ледника (от 10 до 18 тыс. лет назад) (Брайцева и др., 1968) обусловило начало процессов

расселения, реколонизации и формирования современной картины подразделенности вида на структурные компоненты – популяции.

Заключение

В результате проведенных исследований на основе двух генетических методов – анализа изменчивости аллельных частот аллозимных локусов и анализа изменчивости структуры митохондриальной ДНК, описана генетическая дифференциация азиатских популяций чавычи, и проведена оценка популяционной дивергенции на всем ареале данного вида.

Сравнительный анализ распределений генных частот на протяжении всего ареала, включающего его азиатскую и американскую части, показал, что по многим аллозимным локусам наблюдается высокий уровень изменчивости региональных комплексов популяций, при этом часто происходит замена преобладающего аллеля. В исследованных популяциях обнаружено 28 локусов, географическая изменчивость которых имеет характер клинальной, что, вероятно, отражает особенности миграционных потоков в период колонизации современных речных систем в период отступления ледников после Плейстоценового оледенения.

Выявлена достоверная генетическая межпопуляционная гетерогенность азиатской чавычи. Региональная изменчивость генетической структуры популяций четко выражена и позволяет выделить два региональных популяционных комплекса – Западная и Восточная Камчатка.

Кластерный и многофакторный анализы генетических расстояний, определенных на основе изменчивости аллельных частот полиморфных аллозимных локусов, показали, что генетическая дифференциация соответствует пространственной подразделенности видового ареала. В структуре UPGMA-дендрограмм, также как и при многомерном шкалировании, кластеризация по генетической близости согласуется с географической приуроченностью популяций, что свидетельствует о генетическом своеобразии региональных популяционных комплексов. Создана реперная база данных, включающая мультилокусные характеристики по аллозимным генам большинства крупных популяционных систем ареала вида, на основе которых может осуществляться идентификация региональной принадлежности смешанных морских уловов в период нагульных и преднерестовых миграций чавычи.

Получены результаты исследования полиморфизма мтДНК у чавычи азиатских популяций. ПДРФ-анализ с применением восьми эндонуклеаз рестрикции позволил выявить изменчивость нуклеотидных последовательностей в трех амплифицированных участках мтДНК по 6 полиморфным рестриктным сайтам. Анализ распределения частот комбинированных гаплотипов чавычи Камчатки и изменчивости числа нуклеотидных замен

позволил оценить внутри- и межпопуляционные генетические различия. При сравнении выборок из локальных популяций чавычи Азии статистически подтверждена их гетерогенность по структуре митохондриального генома, что свидетельствует о внутривидовой генетической подразделенности. При попарном сравнении выборок, между большинством сравниваемых пар обнаружены значимые различия. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования митохондриального генома в различных аспектах популяционных исследований в качестве информативного генетического маркера.

Выявленные отличия в числе нуклеотидных замен в мтДНК камчатских популяций свидетельствуют о том, что азиатской чавыче свойственно небольшое эволюционное разнообразие, что подтверждается относительно малыми межпопуляционными генетическими расстояниями и, соответственно, невысоким уровнем генетической дивергенции. Вероятной причиной относительно неглубокой дивергенции камчатских популяций по мтДНК может являться их исторически недавнее происхождение из предковой популяции с единым генным пулом. В этом случае небольшие межпопуляционные различия могут быть обусловлены небольшим временем самостоятельной эволюции.

Высказано предположение, что максимальное время дивергенции для камчатских популяций чавычи, величина различий между которыми составляет около 0.02% нуклеотидных замен, соответствует оценке во временном интервале, не превышающем 10–20 тыс. лет. Вероятно, отступление позднеплейстоценового ледника обусловило начало процессов расселения, реколонизации и формирования современной картины подразделенности вида на структурные компоненты. Представленные ранее палеогеографические данные показывают, что описанные особенности межпопуляционной генетической дифференциации согласуются с историей позднеплейстоценовых оледенений, которые были ясно выражены на Камчатке и побережье Охотского моря (Баранова, Бискэ, 1964; Мелекесцев и др., 1974; Глушкова, 1984; Беспалый, Глушкова, 1987). После отступления ледника, сохранившиеся в различных рефугиумах популяции, занимали экологически соответствующие ниши (Алтухов, 1997). Свидетельствами определенных сценариев расселения и процессов формирования современной внутривидовой структуры являются, в первую очередь, генетические особенности популяций.

Выводы

1. Выявлена статистически значимая межпопуляционная генетическая гетерогенность чавычи Азии по аллельной изменчивости исследованных аллозимных локусов и гаплотипам мтДНК.
2. Для региональных групп популяций Восточной Камчатки, бассейна р. Большая, центральной Западной и Северо-Западной Камчатки характерно генетическое

своеобразие, позволяющее по изменчивости частот аллозимных локусов идентифицировать данные регионы в смешанных морских скоплениях.

3. Создана основа для формирования базы данных по частотам аллелей аллозимных локусов чавычи. Выявлены наиболее информативные, с точки зрения анализа популяционной изменчивости, аллозимные локусы. Наиболее дискриминирующими в пределах азиатской части ареала являются 10 локусов – *sAH1**, *ALAT**, *GPIA**, *sIDHP2**, *mMDH2**, *sMEP1**, *sMEP2**, *MPI**, *mSOD1**, *TPI4**; Азию и Северную Америку хорошо дифференцируют 23 локуса – *mAAT1**, *mAAT2**, *sAAT1,2**, *sAAT3**, *ADA1**, *sAH1**, *GPIB2**, *IDDH1**, *sIDHP1**, *sIDHP2**, *mMDH2**, *sMDHB1,2**, *sMEP1**, *sMEP2**, *MPI**, *PEPLT**, *PEPA**, *PEPB1**, *PEPD2**, *PGK2**, *PGM2**, *sSOD1**, *TPI4**.
4. Географическая изменчивость 28 аллозимных локусов чавычи имеет характер клинальной, что, вероятно, отражает особенности миграционных потоков в период колонизации современных речных систем.
5. Наиболее высокие оценки межпопуляционного разнообразия по аллозимным локусам свойственны североамериканским популяциям чавычи.
6. Невысокий уровень изменчивости митохондриальных гаплотипов, выявленных в камчатских популяциях, свидетельствует о небольшом эволюционном разнообразии азиатской чавычи.
7. Несмотря на достоверный уровень гетерогенности азиатской чавычи по структуре мтДНК, межпопуляционная дивергенция на этой части ареала в целом невелика.
8. Вероятной причиной относительно неглубокой дивергенции камчатских популяций чавычи по структуре мтДНК может являться их исторически недавнее происхождение. Максимальное время самостоятельной эволюции азиатской чавычи соответствует оценке во временном интервале, не превышающем 10–20 тыс. лет.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Варнавская Н.В., **Шпигальская Н.Ю.** Генетическое разнообразие азиатских популяционных комплексов тихоокеанского лосося – чавычи, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum) / Тез. докл. Межд. конф. «Новые технологии в защите биоразнообразия в водных экосистемах», Москва, 27–29 мая 2002 г. – М.: МАКС Пресс, 2002. С. 87.
2. Варнавская Н.В., **Шпигальская Н.Ю.**, Савин В.А. Оценка дивергенции искусственно-природных и естественных популяций чавычи и кеты Камчатки / Тез. докл. Межд. конф. «Новые технологии в защите биоразнообразия в водных экосистемах», Москва, 27–29 мая 2002 г. – М.: МАКС Пресс, 2002. С. 86.
3. Varnavskaya N., Templin W., **Shpigalskaya N.** Genetic stock identification of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum) / Abstracts of NPAFC Int. Workshop «Application of Stock Identification in Defining Marine Distribution and Migration of Salmon» (Honolulu, Hawaii, USA, November 1–2, 2003). P. 53.
4. Varnavskaya N., **Shpigalskaya N.** Genetic stock identification of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum) / Thesis of NPAFC Int. Workshop «Application of Stock Identification in Defining Marine Distribution and Migration of Salmon» (Honolulu, Hawaii, USA, November 1–2, 2003). – NPAFC Tech. Rep. 2004. № 5. P. 76–78.
5. Brykov V.V., **Shpigalskaya N.Yu.**, Kukhlevsky A.D., Varnavskaya N.V. Mitochondrial DNA variation in populations of Asian chinook salmon / Proc. NPAFC Intern. Workshop «BASIS-2004: Salmon and Marine Ecosystems in the Bering Sea and Adjacent Waters». Sapporo, October 30–31, 2004. P. 71.
6. Варнавская Н.В., **Шпигальская Н.Ю.**, Шапорев Р.А. Изменчивость частот ферментных генов в популяциях чавычи, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), Азии / Популяционная биология, генетика и систематика гидробионтов. Сб. научных трудов КамчатНИРО. Т. 1. – Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 2004. С. 84–96.
7. **Шпигальская Н.Ю.** Межпопуляционные различия по структуре митохондриальной ДНК у чавычи // Материалы отчетной сессии КамчатНИРО по итогам НИР в 2004 г. – Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 2005. С. 83–92.
8. **Шпигальская Н.Ю.**, Варнавская Н.В., Брыков В.А. Генетическая изменчивость чавычи, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), Азии на основе анализа частот аллозимных генов и структуры митохондриальной ДНК // Ихтиологические исследования на внутренних водоемах: Материалы Межд. науч. конф. / А.Б. Ручин, отв. ред. – Саранск: Мордов. гос. ун-т, 2007. С. 192–194.
9. **Шпигальская Н.Ю.**, Варнавская Н.В. Генетическая дифференциация популяций чавычи *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum) // Современное состояние и пути развития популяционной биологии: Материалы X Всероссийского популяционного семинара. Ижевск, 17–22 ноября 2008 г. Ижевск: КнигоГрад, 2008. С. 382–384.
10. **Шпигальская Н.Ю.**, Брыков Вл.А., Гарретт А.Дж., Кухлевский А.Д., Шапорев Р.А., Варнавская Н.В. Межпопуляционная изменчивость митохондриальной ДНК чавычи, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), Камчатки // Генетика. 2008. Т. 44, № 7. С. 972–982.

Нина Юрьевна Шпигальская

Генетическая дифференциация азиатских популяций тихоокеанского лосося – чавычи,
Oncorhynchus tshawytscha (Walbaum)

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 2010 г. Формат 60x90/16. 1 уч.-изд. Л.
Тираж 100 экз. Заказ № .
Отпечатано в редакционно-издательском отделе ФГУП «КамчатНИРО»
г. Петропавловск-Камчатский, ул. Набережная, 18