

Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря.
Материалы IX международной конференции
11-14 октября 2004 г., Петрозаводск, Карелия, Россия
Петрозаводск, 2005. С. 62-66.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ СИГОВ БАССЕЙНА БЕЛОГО МОРЯ

Е.А. БОРОВИКОВА, Н.Ю. ГОРДОН, Д.В. ПОЛИТОВ

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

С помощью метода рестриктоного анализа ПЦР-амплифицированного фрагмента митохондриальной ДНК (мтДНК), кодирующего субъединицу 1 NADH-дегидрогеназного комплекса (ND 1), получены данные о генетической дифференциации популяций сига *Coregonus lavaretus* (L.) бассейна Белого моря. Описан полиморфизм популяций по сайтам 17 эндонуклеаз рестрикции. Выявлены генетические различия взятых в анализ популяций: при UPGMA-кластеризации сига р. Умбы, Сев. Двины, Кубенского оз. (Вологодская обл.) образуют одну группу, в то время как сига р. Кереть и Сязозера (Карелия) – другую. Полученные данные свидетельствуют о возможности существования в Бело-Баренцевоморском приледниковом убежище собственной расы сига, давшей начало современным популяциям сигов Сев. Двины и р. Умбы.

E.A. Borovikova, N.Yu. Gordon & D.V. Politov. Genetic differentiation of the European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) populations of the White Sea basin // The study, sustainable use and conservation of natural resources of the White Sea. Proceedings of the IXth International Conference, October, 11-14, 2004. Petrozavodsk, Karelia, Russia. Petrozavodsk, 2005. P. 62-66.

Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) in the PCR-amplified NADH-dehydrogenase-1 gene of the mtDNA have been used to analyse variability within and between seven populations of the European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) of the White Sea basin. Analysis of genetic divergence among whitefish populations revealed two distinguished groups: 1) Umba River (Murmansk region), Severnaya Dvina River (Arkhangelsk region), Kubenskoe Lake (Vologda region) and 2) Keret' River, Lake Syamozero (Karelia). These data evidence for the origin of whitefish populations of Umba River, Severnaya Dvina River and Kubenskoe Lake from distinct White Sea – Barents Sea refugial race, which differs from the Baltic and Siberian lineages.

Введение

Сиговые рыбы (подсем. *Coregoninae*, отр. *Salmoniformes*) широко распространены в ледовито-морском и балтийскоморском бассейнах, являясь важным компонентом экосистем и объектом рыбного промысла местного значения. Сложная внутривидовая дифференциация сиговых обусловлена их высокой пластичностью и способностью приспосабливаться к меняющимся условиям среды, а также легкостью гибридизации между разными формами (Решетников, 1977, 1980; Пирожников, 1975; Лебедев, 1982; Сендек, 2000, 2003, 2004). Наиболее широко распространены сига полиморфного комплекса форм *Coregonus lavaretus* (L.). В частности, на Северо-Западе России сига этого комплекса представлены множеством морфологических (много- и малотычинковых) и экологических (речных или озерных, жилых или проходных, ранне- или позднерестующих) форм. Особый интерес с точки зрения дифференциации представляют популяции сигов бассейна Белого моря, поскольку здесь при отступлении ледника шла гибридизация с балтийскоморскими формами (Правдин, 1947; Новиков, 1951). Кроме того, именно с водоемами бассейна Белого

моря связано проникновение сигов с территории Сибири в Европейскую часть России (Решетников, 1977, 1980; Шапошникова, 1977).

В свете объективной сложности идентификации и установления родственных взаимоотношений сигов, связанных с использованием морфоэкологических критериев (Берг, 1948; Решетников, 1977, 1980; Китаев, 1976, 1981) в последнее время все большее значение приобретают молекулярно-генетические методы (Bodaly et al., 1994; Politov et al., 2000, 2002, 2004; Сендек, 2000, 2003; Sendek, 2004).

Настоящее исследование посвящено генетической дифференциации сигов бассейна Белого моря в свете данных анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) амплифицированного в полимеразной цепной реакции (ПЦР) ND1-фрагмента мтДНК.

Материал и методика

Для исследования были взяты семь выборок сига обыкновенного *Coregonus lavaretus* (L.) из водоемов бассейна Белого моря. Места взятия выборок показаны на карте-схеме (рис. 1).

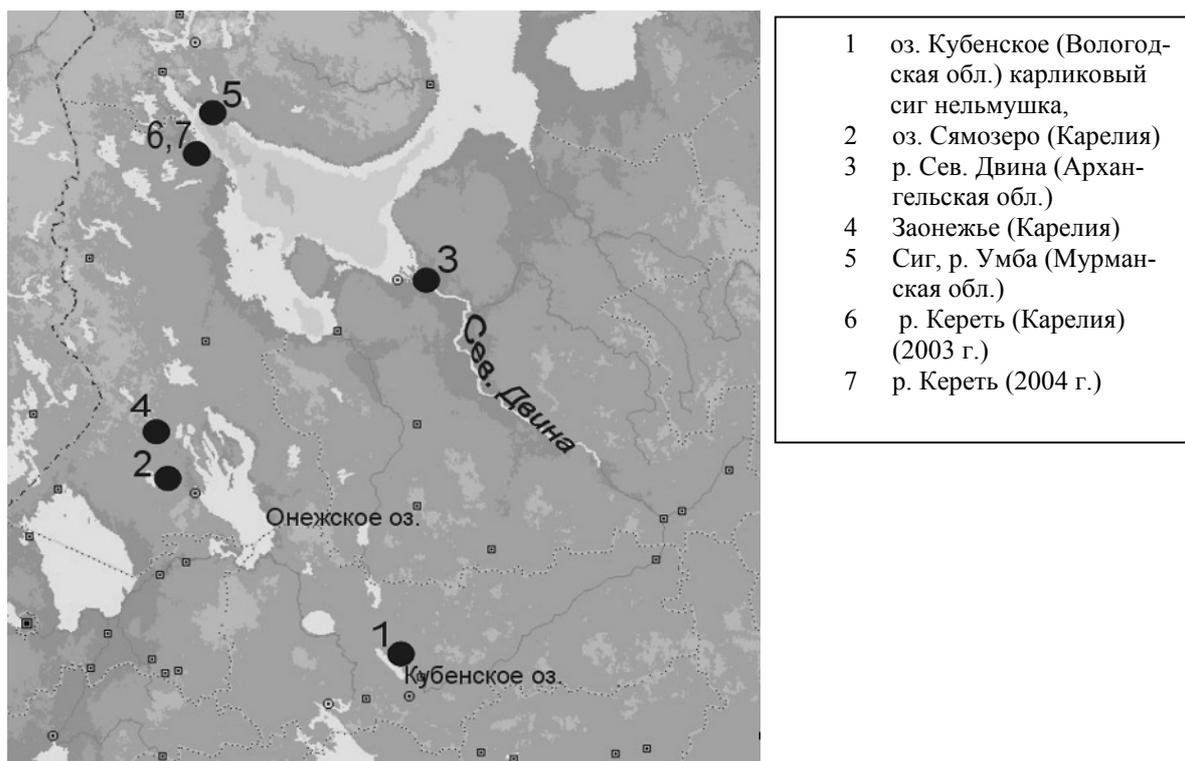


Рис. 1. Места взятия выборок

Препараты тотальной ДНК выделяли из тканей, фиксированных этиловым спиртом, по общепринятой методике (Маниатис и др., 1984), включающей лизис ткани 1% SDS в присутствии протеиназы К и депротенинизацию фенолом. Исследовали изменчивость мтДНК с помощью ПЦР-ПДРФ анализа фрагмента ND-1. Для амплификации использовались олигонуклеотидные праймеры LGL381 и LGL563 (Cronin et al., 1993). Полимеразную цепную реакцию проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей по 10 пМ каждого праймера, 10-кратную смесь dNTP (10 мМ), 10-кратный Taq-буфер, 1,5 ед. активности Taq-полимеразы и 100-200 нг тотальной ДНК. Режим протекания реакции был следующим: предварительная денатурация ДНК – 5 мин. при 95°C; 32 цикла составляли денатурация – 1 мин. при 95°C; гибридизация праймеров – 50 сек. при 54°C; элонгация – 1 мин. 45 сек. при 72°C; завершающее наращивание продукта – 5 мин. при 72°C. Фрагмент ND-1 обрабатывали рестрикционными эндонуклеазами в условиях, рекомендованных изготовителем («Сибэнзим», г. Новосибирск; Fermentas, Литва). В работе были использованы следующие рестриктазы: Ase I, Ava II, BsaJ I, Bsp 1286 I, BstN I, BstU I, Dde I, Dpn II, Hae III, Hha I, Hinc II, Hinf I, Hph I, Nci I, Rsa I, Msp I, Taq I. Фрагменты рестрикции фракционировали с помощью метода электрофореза в горизонтальной камере в 2,5 %-ном агарозном геле и визуализировали после окрашивания бромистым этидием в УФ-свете. Размер фрагментов определяли с помощью ДНК-маркеров 1 тыс. п.н. и 100 п.н. («Сибэнзим»; Fermentas). При идентификации гаплотипов исходили из получен-

ных ранее данных и системы обозначений (Politov et al., 2000, 2004). Анализ данных выполнен при помощи компьютерной программы TFGA (Miller, 1997). Для построения дендрограмм применен метод UPGMA-кластеризации по величинам генетических расстояний D_N (Nei, 1978).

Результаты

Данные, полученные в результате ПЦР-ПДРФ анализа ND1 фрагмента мтДНК, показали, что по сайтам семи рестриктирующих эндонуклеаз все выборки сегов мономорфны (табл. 1). В выборках разных лет из популяций сига р. Кереть обнаружен полиморфизм по сайтам 6 рестриктаз, популяция нельмушки, сямозерского сига, сига С. Двины – по сайтам 5 рестриктаз, популяция сига р. Умбы – по сайтам 4 рестриктаз. Интерес представляет тот факт, что полиморфными у сегов разных популяций оказались сайты различных эндонуклеаз рестрикции. Так у нельмушки полиморфны сайты Dpn II, Dde I, BstN I, Hph I, Rsa I; у сига Сев. Двины – Ava II, Dde I, Dpn II, Hph I; у сига Сямозера – Ava II, Bsp 1286 I, Dpn II, Hae III, Rsa I; у сига р. Умба – Ava II, BsaJ I, Msp I, Rsa I; у сегов р. Кереть разных лет полиморфны – Ava II, Bsp 1286 I, Dpn II, Hae III, Rsa I, Msp I. В целом отмечен низкий уровень полиморфизма: доля полиморфных сайтов рестрикции не превышает 29%. Для сегов р. Кереть доля полиморфных сайтов составила 35%. Всего среди семи популяций было идентифицировано 16 гаплотипов (Табл. 1). Наибольшее разнообразие гаплотипов наблюдается в популяции нельмушки: среди 25 особей встречается семь гаплотипов.

Генетическая подразделенность популяций сига невелика: показатель межпопуляционной дифференциации F_{ST} по всем рестриктазам равен 0,2860. Наиболее сильно дифференцируются популяции по рестриктазам Ava II, Bsp1286 I, Dpn II, Hae III, Rsa I, Msp I, Dde I, Hph I. Генетические дистанции Нея между популяциями представлены в таблице 2.

Кроме того, в ходе работы описаны новые гаплотипы по рестриктазам Msp I – (сиг р. Умба, сиг р. Кереть) – гаплотип N_w; Rsa I – гаплотип К (сиги р. Кереть); Hph I – гаплотип С (нельмушка); Dde I – гаплотип В1 (нельмушка, сиг Сев. Двины).

Таблица 1. Частоты встречаемости 16 обобщенных гаплотипов среди семи популяций сига бассейна Белого моря (гаплотипы описаны на основании анализа данных по 17-ти рестриктазам: Ase I, Ava II, BsaI I, Bsp 1286 I, BstN I, BstU I, Dde I, Dpn II, Hae III, Hha I, Hinc II, Hinf I, Hph I, Msp I, Nci I, Rsa I, Taq I)

№	Гаплотип	Выборка*							Общее число
		1	2	3	4	5	6	7	
I	GWGWABAWGAWAWA	8		1					9
II	GWGWABAWGAWGAWA	3	1	4		23	3	4	38
III	GWWGO ₁ AB ₁ AWGAWGAWA	1							1
IV	GWGWAB ₁ AWGAWGAWA	10		1					11
V	GWGWAB ₁ AWGAWCWA	1							1
VI	GWGWABBWGAWGAWA	1	3						4
VII	GWWGO ₁ ABAWGAWGAWA	1							1
VIII	GRWWWABAO ₁ GAWGAWA		3		3		4	10	20
IX	GWGWABBWGAWGAWA		3	1					4
X	GGGWABBWGAWGAWPW			1					1
XI	GWGWABAWGAWGN _w AWA					4	2		6
XII	GGGWABAWGAWGAWA					1	1		2
XIII	GW ₁ GOABAWGAWGAWA					1			1
XIV	GWGWABBWGAWGAWA							10	10
XV	GRWWWABAO ₁ GAWGN _w AWA							3	3
XVI	GWGWABBWGAWGN _w AW ₁ A						1		1
Всего		25	10	8	3	29	11	27	113

* Номера выборок в таблице соответствуют номерам выборок на рисунке 1

Таблица 2. Генетические дистанции D_N между популяциями сига бассейна Белого моря (по Nei, 1978)

Популяция	1	2	3	4	5	6	7
1	*****						
2	0,0629	*****					
3	0,0123	0,0217	*****				
4	0,2281	0,1224	0,1990	*****			
5	0,0249	0,0461	0,0085	0,2010	*****		
6	0,0486	0,0086	0,0204	0,0862	0,0237	*****	
7	0,0852	0,0124	0,0484	0,0731	0,0617	0,0085	*****

Номера выборок в таблице соответствуют номерам выборок на рисунке 1.

UPGMA-кластеризация выборок сига бассейна Белого моря представлена на рис. 2.

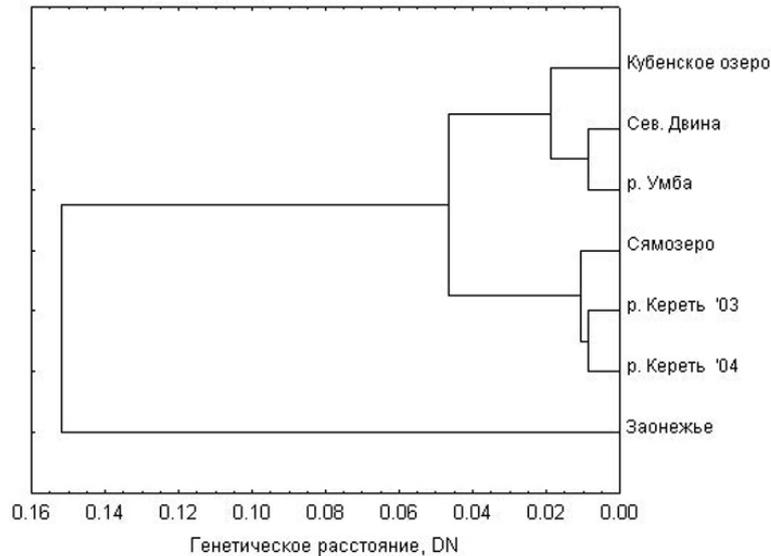


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма на основе матрицы генетических расстояний (Nei, 1978) между выборками из популяций сига бассейна Белого моря

Обсуждение

1

ПЦР-ПДРФ анализ фрагмента ND1 мтДНК выявил несколько интересных особенностей в генетической дифференциации популяций сига бассейна Белого моря. Согласно данным анализа можно выделить две группы популяций сига. Первая группа включает в себя сига р. Умбы, Сев. Двины и эндемичную популяцию карликового сига-нельмушки – жилой формы Кубенского озера (Вологодская обл.). Вторую группу составляют сиги р. Кереть, а также сиги Сямозера. Таким образом, генетические данные настоящего исследования согласуются с данными анализа аллозимной изменчивости (Сендек, 2000, 2003, 2004) и могут служить подтверждением выводов о возможности существования в Бело-Баренцевоморском приледниковом убежище собственной расы сига, давшей начало современным популяциям сига Сев. Двины и р. Умбы. Жилая форма Кубенского озера – карликовый сиг нельмушка согласно молекулярно-генетическим данным происходит от исходной бело-баренцевоморской расы сига и близок в своем происхождении малотычинковым сигам Сев. Двины, о чем писал еще В.Г. Лебедев на основе анализа морфоэкологических данных (Лебедев, 1982). Происхождение и близость друг другу сига р. Кереть и Сямозера можно объяснить с одной стороны, исходя из данных палеолимнологических (Квасов, 1975) и ихтиологических (Кудерский, 1987) исследований, согласно которым на короткий промежуток времени при отступлении ледника сток из приледниковых озер шел в направлении с востока на запад через систему Верхне-Воложских озер через Вытегорское и Белое озера в восточную часть котловины оз. Онежское. Возможно как раз в это время с востока на запад проникли предковые формы сига р. Кереть, Сямозера. Кроме наших данных сходство сига-пыжьяна и сямозерского сига отмечено в ряде более ранних срав-

нительных исследований белков и ферментов (Локшина, 1981). Однако есть данные о возможном вселении отдельных элементов ихтиофауны Белого моря из бассейна Балтийского моря (Осинов, Берначе, 1996; Махров и др., 1999; Кудерский, 1961; Первозванский, 1986; Махров, Иешко, 2001; Makhrov et al., 2002). Возможно, что сходство сямозерских сига и сига р. Кереть – результат расселения их в поздне- и послеледниковый периоды, когда пресноводные водоемы бассейнов Белого и Балтийского морей были связаны (Квасов, 1975; Демидов, 1993).

Таким образом, наблюдаемая генетическая дифференциация популяций *Coregonus lavaretus* (L.) бассейна Белого моря в значительной мере отражает пути заселения Европейского севера России предковыми формами сига. Дальнейший прогресс в филогеографической реконструкции истории расселения сига комплекса *C. lavaretus* должен базироваться на расширении набора исследуемых молекулярно-генетических маркеров, тщательном сравнительном анализе генетических, морфологических и экологических данных, географии и численности выборок.

Работа поддержана программами Российской академии наук «Динамика генофондов», «Биоразнообразии», а также программой «Поддержка научных школ». Авторы благодарят В. Артамонову, Н.Л. Болотову, Н.В. Гордееву, Н.В. Думнич, А.Ф. Коновалова, А.А. Махрова, О.П. Стерлигову, А.Ф. Шарова и Ю.Н. Шарову за помощь в сборе материала.

Литература

- Берг Л.С. 1948. Рыбы пресных вод и сопредельных стран. М.; Л.: Изд-во АН СССР. Ч. 1. 467 с.
Демидов И.Н. 1993. Строение ленточных глин и особенности дегляциации Центральной Карелии // Вопросы

- геологии докембрия Карелии. Петрозаводск. С. 127-151.
- Квасов Д.Д. 1975. Позднечетвертичная история крупных озер и внутренних морей Восточной Европы.
- Кутаев С.П. 1976. Морфоэкологическая структура вида *Coregonus lavaretus* (L.) // Институт биологии карельского филиала АН СССР. Лососевые (*Salmonidae*) Карелии. Петрозаводск. С. 42-46.
- Кутаев С.П. 1981. О систематике сиговых рыб Европы // Тез. докл. Второго Всесоюз. совещ. по биологии и биотехнике разведения сиговых рыб. Петрозаводск. С. 11-13.
- Кудерский Л.А. 1961. Некоторые особенности географического распространения рыб в водоемах западной части бассейна Белого моря // Материалы по зоогеографии Карелии. Петрозаводск. Вып. 1. С. 3-7.
- Кудерский Л.А. 1969. Роль приледниковых водоемов в формировании пресноводной ихтиофауны Северо-Запада европейской части СССР // В сб.: Восьмая сессия ученого Совета по проблеме «Биологические ресурсы Белого моря и внутр. водоемов Карелии» (тезисы докл.). Петрозаводск.
- Лебедев В.Г. 1982. Происхождение и систематическое положение нельмушки *Coregonus lavaretus nelmuschka* Pravdin // Сб. научн. трудов ГосНИОРХ. Л. Вып. 183. С. 58-70.
- Локишина А.Б. 1981. Сравнительное электрофоретическое исследование белков изоферментов сигов // Тез. докл. Второго Всесоюз. совещ. по биологии и биотехнике разведения сиговых рыб. Петрозаводск. С. 17-18.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Махров А.А., Кузицин К.В., Новиков Г.Г. 1999. Генетическая дифференциация кумжи *Salmo trutta* L. из водоемов бассейна пролива Великая Салма (Белое море) // Генетика. Т. 35. №7. С. 969-975.
- Махров А.А., Иешко Е.П. 2001. Генетическая дифференциация и послеледниковое расселение кумжи (*Salmo trutta* L.) бассейна Белого моря // Тр. КарНЦ РАН. Петрозаводск, вып. 2. С. 176-179.
- Новиков П.И. 1951. О нахождении сигов балтийскоморского происхождения в западной части бассейна Белого моря // Известия Карело-финского филиала АН СССР. № 1. С. 89-91.
- Осинов А.Г., Берначе Л. 1986 «Атлантическая» и «дунайская» филогенетические группы кумжи *Salmo trutta* complex: генетическая дивергенция, эволюция, охрана // Вопросы ихтиологии. Т.36. № 6. С. 762-786.
- Первозванский В.Я. 1986. Рыбы водоемов района Костомукшского железнорудного месторождения. Петрозаводск «Карелия». 261 с.
- Правдин И.Ф. 1947. Морфо-биологическая классификация и генезис сигов (род *Coregonus* s. str.) Ладожского озера // Известия Карело-финской научно-исследовательской базы АН СССР. № 1-2. С. 75-85.
- Пирожников П.Л. и др. 1975. О таксономическом ранге и филогении сиговых (*Coregonidae*, *Pisces*) // Известия ГосНИОРХ. Л., Т. 104. С. 5-16.
- Решетников Ю.С. 1977. Сложные вопросы таксономии сиговых рыб и проблемы зоогеографии // Основы классификации и филогении лососевых рыб. Л. С. 71-78.
- Решетников Ю.С. 1980. Экология и систематика сиговых рыб. М.: Наука. 300 с.
- Сендек Д.С. 2000. Филогенетический анализ сиговых рыб сем. *Coregonidae* методом белкового электрофореза. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. СПб.: ГосНИОРХ. 22 с.
- Сендек Д.С. 2003. О происхождении трех симпатрических форм европейского сига (*Coregonus lavaretus* L.) Ладожского озера по данным сравнительного генетического анализа популяций сигов Северо-Запада России // Тез. докл. междунар. конф. «Биол. ресурсы Белого моря и внутр. водоемов Европейского Севера». Сыктывкар. С. 77-78.
- Шапошникова Г.Х. 1977. История расселения сигов полиморфного вида *Coregonus lavaretus* (L.) и некоторые соображения о его внутривидовой дифференциации // Основы классификации и филогении лососевых рыб. Л. С. 78-86.
- Bodaly R.A., Vuorinen J.A., Reshetnikov Yu.S. & Reist J.D. 1994. Genetic relationships of five species of coregonid fishes from Siberia // J. of Ichthyology. Vol. 34. P. 117-130.
- Cronin M. A., Spearman W.J., Wilmot R.L., Patton J.C. & Bickham J.W. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. // Canad. J. of Fish. and Aquatic Sci. 1993. V. 50. P. 708-715.
- Makhrov A.A., Skaala O. & Altukhov Yu.P. 2002. Alleles of sAAT-1,2 isoloci in brown trout: potential diagnostic marker for tracking routes of post-glacial colonization in northern Europe. // J. of Fish Biology. Vol. 61. P. 842-846.
- Miller M.P. 1997. TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses). V.1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. Vol. 89. P. 583-590.
- Politov D.V., Gordon N.Yu. Afanasiev K.I., Altukhov Yu. P. and Bickham J.W. Identification of paleartic coregonid fish species using mtDNA and allozyme genetic markers // J. of Fish Biol. 2000. V. 57. (Suppl. A). P. 51-71.
- Politov D.V., Gordon N. Yu. & Makhrov A.A. Genetic identification and taxonomic relationships of six Siberian species of *Coregonus*. // Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. 2002. V. 57. P. 21-34.
- Politov D.V., Bickham J.W. & Patton J.C. Molecular phylogeography of Palearctic and Nearctic ciscoes. // Ann. Zool. Fennici. 2004. V. 41. P. 13-23.
- Sendek D.S. 2004. The origin of sympatric forms of European whitefish (*Coregonus lavaretus* (L)) in Lake Ladoga based on comparative genetic analysis of populations in North - West Russia // Ann. Zool. Fennici. Vol. 41. P. 25-39.