

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА НЕРКИ АЗИАТСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ ТИХОГО ОКЕАНА

© 2017 г. А. М. Хрусталева^{1, *}, Н. В. Кловач¹, Дж. Е. Сиб²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва 107140

²School of Aquatic & Fishery Sciences, University of Washington, Seattle, WA, 355020 USA

*e-mail: mailfed@mail.ru

Поступила в редакцию 27.12.2016 г.

Проанализированы данные по изменчивости шести микросателлитных локусов и 45 локусов однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в 17 выборках из 10 крупнейших водоемов воспроизводства нерки на азиатском побережье Тихого океана. По результатам анализа варибельности SNP-локусов нерки на рассматриваемой части ареала выявлены пять групп популяций, среди которых локальные стада рек Палана, Охота и Камчатка, а также группы популяций Юго-Западной Камчатки и Северо-Восточной Камчатки и Чукотки. Несколько иная картина подразделенности исследованных выборок была получена по оценкам изменчивости шести микросателлитных локусов ДНК: выделены региональные комплексы восточного и западного побережий Камчатки, при этом нерка р. Палана попадает в кластер западно-камчатских популяций, в то время как приуроченные к субпериферии ареала популяции р. Охота и Мейныпильгынской озерно-речной системы (Чукотка) в наибольшей степени дифференцированы от остальных. Обсуждаются возможные причины выявленных расхождений и высокой дивергенции паланской и охотской нерки, обнаруженной по данным анализа SNP-маркеров.

Ключевые слова: нерка, однонуклеотидный полиморфизм (SNP), микросателлиты, дифференциация популяций, популяционная структура.

DOI: 10.7868/S0016675817100058

На сегодняшний день в популяционной генетике тихоокеанских лососей наметились два основных направления молекулярно-генетических исследований, опирающихся на два типа изменчивости генома. Первый из них — это изменчивость в нуклеотидных последовательностях ДНК, которые не кодируют синтез белка и не влияют на фенотипическую экспрессию [1]. Такая изменчивость является селективно нейтральной, а маркеры, ее выявляющие, принято считать нейтральными. К ним в первую очередь относятся такие наиболее популярные в популяционной генетике маркеры, как микросателлитные локусы и условно нейтральные замены в структуре мтДНК, обнаруживаемые с помощью ПДРФ-анализа или полного/частичного секвенирования. Эти методические подходы хорошо зарекомендовали себя в решении таких задач, как исследование филогении и филогеографии видов, выявление популяционной структуры, изучение закономерностей внутривидового формообразования, анализ нейтральных эволюционных процессов в популяциях, а также для оценки ряда демографических параметров, в частности коэффициента миграции, времени дивергенции и пр.

Второй тип изменчивости — это изменчивость, выявляемая селективными маркерами ДНК, отвечающими за изменение функции белка или его экспрессии и таким образом влияющими на приспособленность особей [1–5]. Область их применения в основном сводится к изучению различий между популяциями, связанных с локальными адаптациями, к оценке роли естественного отбора в поддержании генетического полиморфизма на внутривидовом и внутривидовом уровне, экологической обусловленности популяционной структуры. Кроме того, зачастую селективные маркеры позволяют выявлять различия между популяциями даже с малым временем дивергенции, в которых еще не установилось равновесие между генной миграцией и дрейфом, а также в случае, если поток генов между ними настолько велик, что нивелирует различия по нейтральным локусам. Результаты анализа варибельности селективных и нейтральных маркеров могут существенно различаться, так как адаптивная генетическая изменчивость вскрывает популяционную структуру вида, сформированную под действием отбора, в то время как нейтральная структура обусловлена мутационным процессом и демографи-

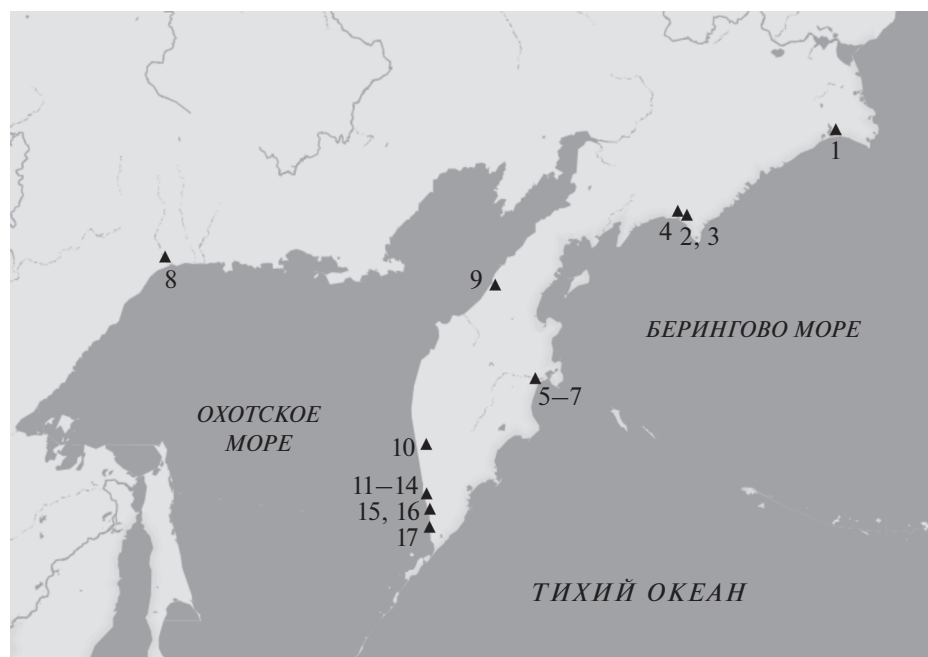


Рис. 1. Карта-схема района сбора материала. Номера выборок как в табл. 1.

ческими факторами [1, 4]. Тем не менее оба подхода успешно дополняют друг друга в зависимости от решаемых задач.

Для выявления адаптивной молекулярно-генетической изменчивости хорошо подходят репрезентативные панели однотипных маркеров (обычно это микросателлиты, AFLP, EST или SNP), насчитывающие несколько десятков локусов, прогенотипированных на достаточно представительном наборе выборок [5]. Обнаружение локусов-аутсайдеров обычно осуществляется с помощью теста на нейтральность, а выводы о селективной нагрузке того или иного локуса зачастую базируются на представлениях о явлении так называемого “генетического попутчика”, при котором сдвиги под давлением отбора в частоте некоего полиморфного локуса ДНК одновременно затрагивают и нейтральный фланкирующий полиморфизм [1, 5].

Комплексный подход к изучению популяционной организации вида с привлечением как нейтральных, так и селективных маркеров, способен дать исчерпывающую информацию не только о демографических и исторических процессах в популяциях, но и о действии локального отбора, обуславливающего их дивергенцию. Это особенно актуально для видов с многоуровневой популяционной структурой и рекуррентной историей формирования ареала, к которым, в частности, относится нерка, обладающая наиболее сложной внутривидовой организацией среди всех тихоокеанских лососей. Цель данной работы — геногеографическое исследование нерки Камчат-

ки, материкового побережья Охотского моря и Чукотки и выявление адаптивной и нейтральной популяционной структуры данного вида на рассматриваемой части ареала на основе анализа изменчивости 45 локусов однонуклеотидного полиморфизма (SNP), а также данных об изменчивости микросателлитных локусов, опубликованных ранее.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлены как новые, так и опубликованные ранее собственные экспериментальные данные по изменчивости локусов ОНП нерки северо-западного побережья Охотского моря, Западной Камчатки [6, 7], Восточной Камчатки и Чукотки [8] (рис. 1, табл. 1).

Исследовали полиморфизм 45 описанных ранее локусов SNP [6, 9–11]. Молекулярно-генетический анализ проводили в лаборатории экологической геномики факультета гидробиологии и рыболовства Университета штата Вашингтон. Методика генотипирования детально изложена в работе [12]. Реакционная смесь, в конечном объеме 9 мкл, содержала 2.5 мкл универсального 2× TaqMan-ПЦР-мастер-микса (Applied Biosystems, PN 4304437), 0.25 единиц AmpliTaq Gold ДНК-полимеразы (Applied Biosystems, PN 4311806), 0.25 мкл 20× буфера для инъекции образцов ДНК GT Sample Loading Reagent (Fluidigm, PN 85000741), 40 нг ДНК, 2.5 мкл 80× праймер/проба микса (16 мкМ каждой пробы, меченной флуоресцентным красителем FAMTM или VICTM,

Таблица 1. Характеристика исследованных выборок нерки

Район	Место вылова (состав выборки)	Номер выборки	Обозначение	Даты вылова	Объем выборки
Чукотка, Наваринский район	Мейныпильгинская оз.-р. система, оз. Ваамочка	1	Ch	28.07.2004	50
Северо-Восточная Камчатка, побережье Олюторского залива	р. Апука (ранняя нерка)	2	KAe	24.06.2008 и 25.06.2008	21
	р. Апука (поздняя нерка)	3	KAI		32
	р. Пахача	4	KPh	17.06.2005–27.06.2005	59
Восточная Камчатка, бассейн р. Камчатка	р. Камчатка (нерка позднего хода)	5	KK-04	29.06.2004–09.07.2004	100
	р. Камчатка (нерка раннего хода)	6	KK-05	14.06.2005	20
	оз. Азабачье, р. Бушуйка (ранняя реофильная нерка)	7	KKa	03.07.2004 и 13.07.2004	81
Материковое побережье Охотского моря	р. Охота	8	Okh	22.07.2004	80
Северо-Западная Камчатка	р. Палана	9	KP	10.07.2003–21.07.2003	100
Западная Камчатка	р. Большая Воровская	10	KV	17.07.2007–27.07.2007	51
Юго-Западная Камчатка	р. Большая (производители)	11	KB-03	23.07.2003–30.07.2003	91
		12	KB-04	11.08.2004 и 20.08.2004	90
	Бассейн р. Большая, р. Быстрая (молодь)	13	KBb	20.07.2004 и 12.08.2004	33
	Бассейн р. Большая, р. Плотникова (молодь)	14	KBp	09.08.2004 и 12.08.2004	39
	р. Опала	15	KOp-07	14.07.2007	50
		16	KOp-08	17.07.2008–30.07.2008	31
	р. Озерная	17	KO	04.08.2003–07.08.2003	95

72 мкМ каждого праймера, 1× ТЕ буфер), 2 мкл 2× буфера для инъекции проб Assay Loading Reagent (Fluidigm, PN 85000736), 0.7 нМ пассивного стандарта флуоресценции (краситель ROX) (Invitrogen, PN 12223-012).

Детекцию SNP проводили методом TaqMan-ПЦР в микроматрицах 96 × 96 (Fluidigm 96.96 Dynamic Array) в термоциклере Fluidigm Stand-Alone

Thermal Cycler (STC) (Fluidigm) по следующей схеме: термическое перемешивание компонентов реакции 50°C – 2 мин, 70°C – 30 мин, 25°C – 10 мин, предварительная денатурация ДНК 95°C – 10 мин; синтез ПЦР-продукта (50 циклов): плавление цепей 92°C – 15 с, отжиг праймеров и синтез ДНК 60°C – 1 мин. Флуоресценцию регистрировали в конечной точке реакции с помощью системы

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия в выборках нерки Чукотки, Камчатки и материкового побережья Охотского моря*

Выборка	H_o (s.d.)	H_e (s.d.)	n_a (s.d.)	$n_{a \text{ корр.}}$ (s.d.)
Ch	0.247(0.171)	0.252(0.189)	1.8(0.41)	1.73(0.41)
KAe	0.243(0.156)	0.252(0.176)	1.8(0.41)	1.77(0.4)
KAl	0.226(0.165)	0.235(0.172)	1.85(0.36)	1.82(0.36)
KPh	0.248(0.173)	0.266(0.18)	1.95(0.22)	1.81(0.31)
KK-04	0.211(0.166)	0.242(0.19)	1.83(0.39)	1.75(0.38)
KK-05	0.225(0.183)	0.263(0.211)	1.7(0.46)	1.7(0.46)
KKa	0.246(0.175)	0.243(0.189)	1.83(0.39)	1.74(0.4)
Okh	0.209(0.173)	0.228(0.204)	1.8(0.41)	1.66(0.43)
KP	0.226(0.155)	0.236(0.187)	1.78(0.42)	1.71(0.42)
KV	0.235(0.185)	0.232(0.187)	1.85(0.36)	1.75(0.37)
KB-03	0.225(0.155)	0.248(0.182)	1.88(0.34)	1.77(0.36)
KB-04	0.242(0.179)	0.257(0.189)	1.93(0.27)	1.77(0.34)
KBb	0.248(0.196)	0.243(0.196)	1.83(0.39)	1.74(0.39)
KBp	0.221(0.166)	0.25(0.201)	1.8(0.41)	1.74(0.4)
KOp-07	0.208(0.179)	0.222(0.186)	1.85(0.36)	1.74(0.37)
KOp-08	0.246(0.176)	0.247(0.189)	1.85(0.36)	1.78(0.36)
KO	0.247(0.188)	0.246(0.186)	1.9(0.3)	1.77(0.35)

Примечание. H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, s.d. – стандартное отклонение; n_a – среднее число аллелей на локус; $n_{a \text{ корр.}}$ – среднее число аллелей на локус, скорректированное на минимальный объем выборки (20 экз.).

* Обозначения выборок как в табл. 1.

BioMark Real-Time qPCR System (Fluidigm), детекцию аллелей осуществляли в программе BioMark Data Collection Software (Fluidigm).

Для сравнения нейтральной и адаптивной популяционной структуры нерки Камчатки, материкового побережья Охотского моря и Чукотки использовали собственные данные по частотам шести микросателлитных локусов в девяти выборках из семи озерно-речных систем обследуемого региона [13]. Для выявления и коррекции нуль-аллелей использовали программы MicroChecker [14] и FreeNA [15]. Визуализацию матрицы попарных F_{ST} проводили в программе IBM SPSS Statistics 19 посредством многомерного шкалирования. Вычисление хордовых генетических дистанций Кавалли-Сфорца и построение дендрограмм методом Neighbors Joining (NJ) осуществляли с помощью программного пакета Phylip-3.695 [16].

Статистическая обработка данных SNP-анализа и используемые программы описаны ранее [7]. Чтобы определить кластерные группы выбо-

рок, мультилокусные SNP-генотипы были проанализированы в программе STRUCTURE 2.3.4 [17], в которой методами численного моделирования (метод цепей Маркова – 1 млн итераций, burn-in период – 500 тыс. итераций) выявляли наличие устойчивых потенциальных компонент (кластеров) в анализируемой совокупности данных (“admixture model”, допускающая гибридное происхождение особей, при условии независимости аллельных частот среди кластеров), определяли наиболее вероятный вариант разделения выборки на заданное число групп K ($K = 1-17$), затем выполняли байесовскую классификацию особей. Анализ числа кластеров проводили в онлайн-программе STRUCTURE HARVESTER: оценивали максимальное значение параметра ΔK [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

43 из 45 проанализированных нами локусов SNP были полиморфны, исключение составили локусы *p53-576* и *RAG1-103*. Проверка неравновесия

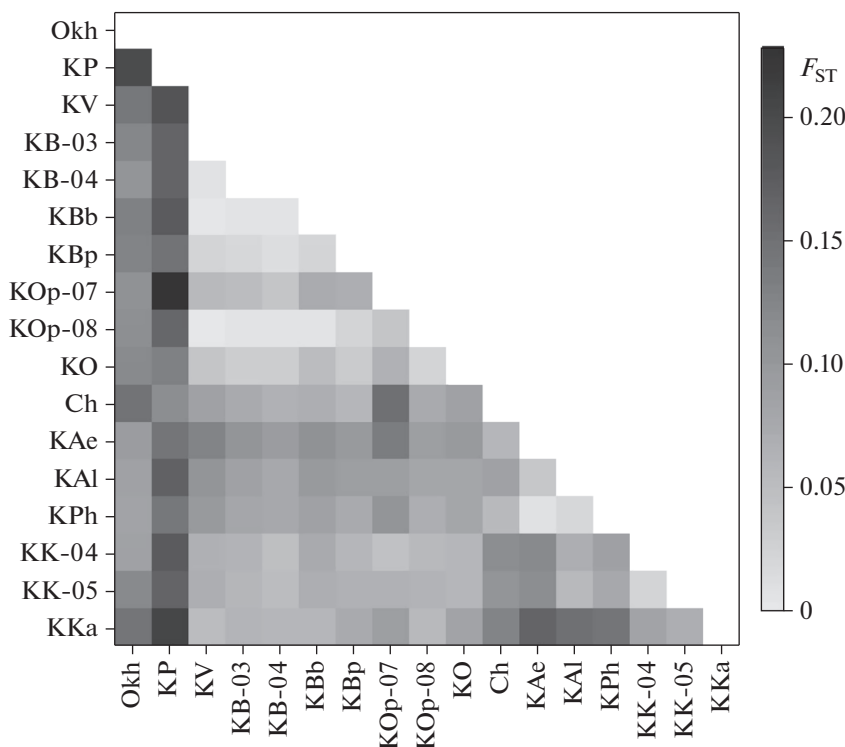


Рис. 2. Матрица парных коэффициентов F_{ST} для выборок нерки Чукотки, Камчатки и материкового побережья Охотского моря. Обозначения как в табл. 1.

по сцеплению выявила корреляцию между генотипами митохондриальных локусов (mtSNP) во всех выборках. По итогам проверки их аллельные варианты были объединены в четыре гаплотипа (локус *Cytb_CO*) [19]. Таким образом, после исключения мономорфных локусов и объединения митохондриальных SNP число анализируемых локусов сократилось до 41.

Оценки внутривидового генетического разнообразия в 17 выборках нерки приведены в табл. 2. После Бонферрони-коррекции значимое несоответствие наблюдаемых и ожидаемых при равновесии Харди–Вайнберга частот генотипов отмечено для нерки р. Камчатка в 2004 г. (KK-04) по локусам *MHC2_190v2* ($p = 0.0003$, $F_{IS} = 0.65$) и *MHC2_251v2* ($p = 0$, $F_{IS} = 0.95$), для нерки бассейна р. Большая: выловленной в устье реки в 2003 г. (KB-03) (*ZNF-61* ($p = 0.0004$, $F_{IS} = 0.39$)) и 2004 г. (KB-04) (*ZNF-61* ($p = 0.0002$, $F_{IS} = 0.40$), *Tf_ex3-182* ($p = 0.0001$, $F_{IS} = 0.49$)) и в верховьях р. Плотникова (KBp) (*MHC2_251v2* ($p = 0.0003$, $F_{IS} = 0.60$)), а также для охотской нерки (Okh) по локусам *GPDH2* ($p = 0.0001$, $F_{IS} = 0.49$) и *GPH-414* ($p = 0.0001$, $F_{IS} = 0.42$).

Между выборками нерки из обследованных нами крупнейших водоемов воспроизводства данного вида в Азии обнаружена значимая гетерогенность аллельных и генотипических частот

локусов SNP. Различия были незначимы (после последовательной Бонферрони-коррекции) лишь для трех пар выборок из водоемов Восточной Камчатки: р. Пахача (KPh) – р. Апука (KAe, KAI) и между выборками смежных лет из устья р. Камчатка (KK-04–KK-05), а также для следующих пар выборок западнокамчатской нерки: р. Большая Воровская (KV) – р. Большая (KB-03, KB-04, KBb), р. Большая Воровская (KV) – р. Опала (KOp-08), р. Большая (KB-03, KB-04, KBb, KBp) – р. Опала (KOp-08). В пределах бассейна р. Большая не обнаружено различий по частотам аллелей и генотипов между выборками смежных лет из устья реки (KB-03–KB-04), а также между ними и выборкой из р. Быстрая (KBb).

Межвыборочное генетическое разнообразие, оцененное величиной F_{ST} , составило в среднем 0.0904 ($p = 0$). Матрица парных F_{ST} представлена на рис. 2. По результатам детекции селективно нагруженных SNP претендентами на воздействие дифференцирующего отбора были локусы главного комплекса гистосовместимости (*MHC2_190v2* и *MHC2_251v2*) ($p < 0.01$) и *GPH-414* ($p < 0.01$), балансирующего отбора – *U504-141* ($p < 0.01$). При повторной детекции в различных комбинациях выборок из водоемов побережья Охотского моря (Западная Камчатка и р. Охота) и отдельно берингоморско-тихоокеанского побережья (Восточная Камчатка и Чукотка) обнару-

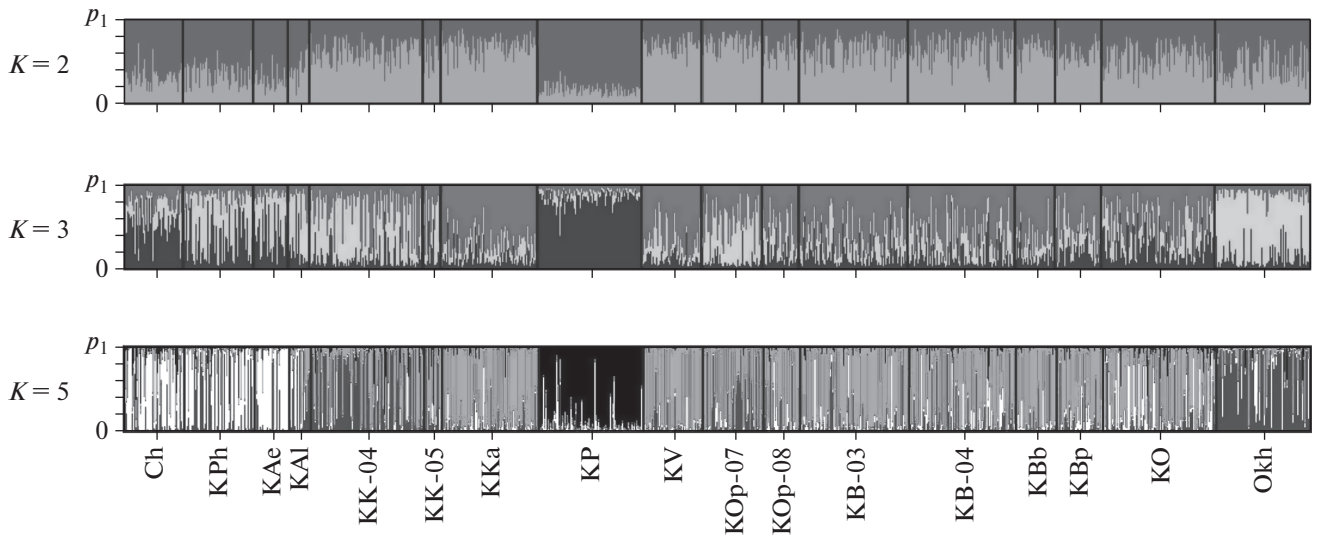


Рис. 3. Кластеризация выборок нерки на основе алгоритма программы STRUCTURE 2.3.4. Разные оттенки серого соответствуют двум ($K = 2$), трем ($K = 3$) и пяти ($K = 5$) кластерам и отображают вероятность (p) принадлежности к ним особей.

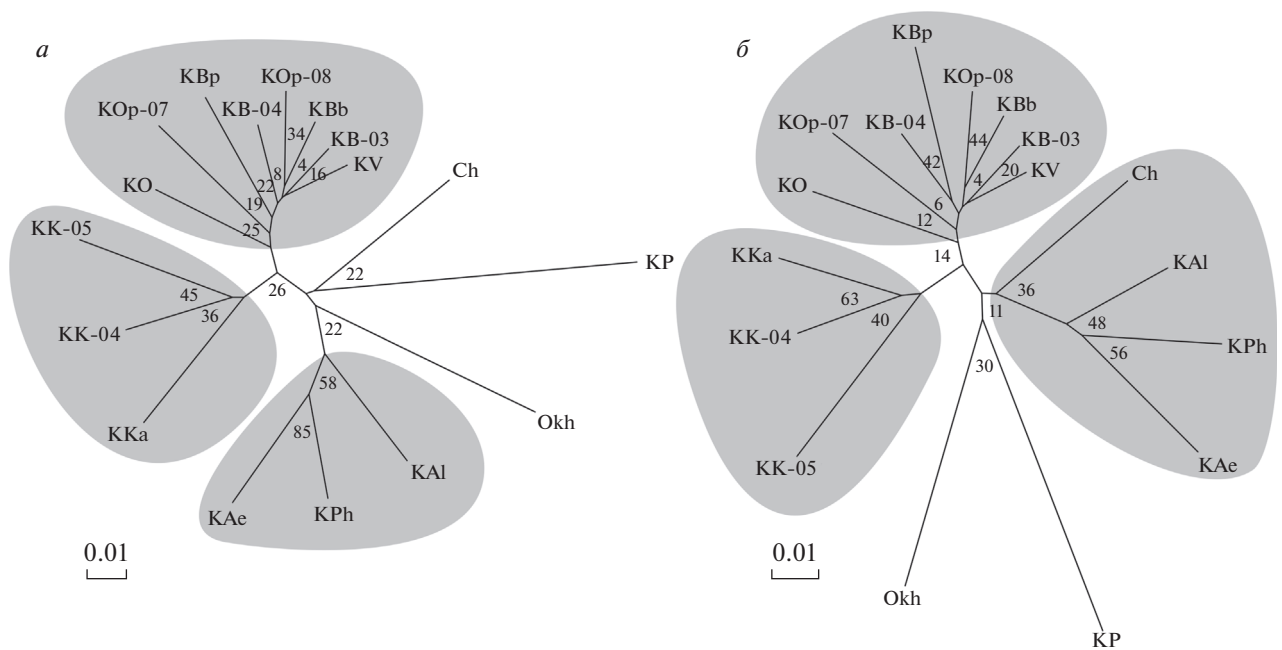


Рис. 4. NJ-дендрограммы, построенные по хордовым дистанциям Кавалли-Сфорца. *a* – по результатам анализа изменчивости 41 SNP; *b* – по результатам анализа изменчивости 35 нейтральных SNP. Цифры – бутстреп-оценки.

жено, что в выборках из рек Западной Камчатки и Охотского района вероятными локусами-кандидатами на воздействие дифференцирующего отбора были *MHC2_251v2* и *GPH-414* ($p < 0.01$), в то время как в озерно-речных системах Восточной Камчатки и Чукотки – *MHC2_190v2* и *GPH-414* ($p < 0.01$), а также *GHI-2461* и *HraI-99* ($p < 0.05$).

По результатам анализа выборок в STRUCTURE 2.3.4 наибольшее значение ΔK соответ-

ствовало пяти кластерам. После первого раунда кластеризации ($K = 2$) отделилась выборка из р. Палана, дальнейшая кластеризация привела к выделению в отдельные кластеры нерки р. Охота и группы выборок западно-беринговоморского побережья ($K = 3$) (рис. 3). В целом распределение выборок по пяти кластерам отражает подразделенность нерки данного региона на пять групп: группа популяций Северо-Восточной Камчатки и Чукотки; популяционный комплекс р. Камчат-

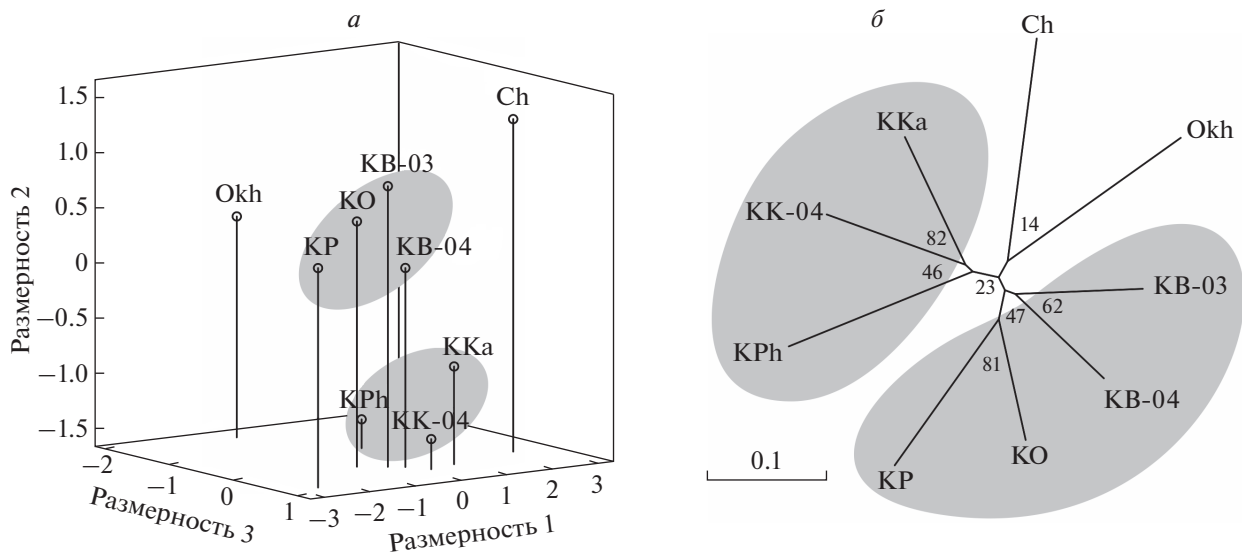


Рис. 5. Диаграмма многомерного шкалирования на основании оценок парных F_{ST} (а) и NJ-дендрограмма, построенная по хордовым дистанциям Кавалли-Сфорца, по результатам анализа изменчивости шести микросателлитных локусов в выборках нерки (б).

ка, в котором выделяется нерка из оз. Азабачье (при исключении локусов группы *MHC* данная выборка не дифференцировалась); популяция р. Палана; низко дифференцированные западно-камчатские популяции и нерка бассейна р. Охота.

Иерархический анализ молекулярной вариации (AMOVA) в сгруппированных выборках показал, что пространственная организация нерки материкового побережья Охотского моря, Камчатки и Чукотки наиболее удовлетворительно описывается двухуровневой структурой с делением на регионы происхождения и отдельные популяции, выявленной с помощью кластеризации выборок в STRUCTURE 2.3.4 ($F_{ST} = 0.107$, $p = 0$).

Популяционная структура нерки материкового побережья Охотского моря, Камчатки и Чукотки отображена в бескорневых дендрограммах (рис. 4), построенных отдельно по всем локусам и по нейтральным SNP. В целом по обеим дендрограммам хорошо прослеживается деление нерки данной части ареала на два крупных кластера, представленных более южными и более северными популяциями. После исключения предположительно селективно нагруженных локусов в дереве более четко обособились клады, соответствующие выделенным ранее группам в программе STRUCTURE 2.3.4.

Анализ распределений генотипов шести микросателлитных локусов в выборках нерки Камчатки, Чукотки и материкового побережья Охотского моря в программе Micro-Checker выявил достоверно значимый дефицит гетерозигот, связанный с присутствием нуль-аллелей, по локусам *One-109* (в выборках из бассейна р. Камчатка и

р. Охота) и *One-114* (чукотская и озерновская нерка). Тесты подтвердили низкую вероятность ошибок амплификации длинных повторов и интер-аллелей для всех локусов. Коррекция частот аллелей (ENA-коррекция [19]) и расчет генетических дистанций выполнены в программе FreeNA. Многомерное шкалирование на основе матрицы попарных значений F_{ST} представлено на рис. 5, а, бескорневая дендрограмма на основе хордовых генетических дистанций Кавалли-Сфорца – на рис. 5, б. Оба построения свидетельствуют о выраженной генетической дивергенции между группами популяций разных географических регионов, в частности Восточной и Западной Камчатки. Так, западно- и восточно-камчатские популяции формируют обособленные кластеры, в то время как популяции рек Ваамочка (Чукотка) и Охота, находящиеся на краю ареала, наиболее дифференцированы от остальных.

Следы недавнего сокращения эффективной численности популяции (бутылочное горлышко) по результатам соответствующих тестов (критерий знаков, критерий стандартизованной разности и критерий Вилкоксона) были выявлены во всех выборках по нейтральным локусам SNP ($p < 0.05$). Однако смещение распределений частот аллелей, свидетельствующее о прохождении через бутылочное горлышко, наблюдалось лишь в популяциях из озерно-речных систем Восточной Камчатки и Чукотки, а также из р. Палана, и не обнаруживалось ни в одной из выборок по микросателлитным локусам. По результатам теста Вилкоксона для двухфазной модели мутаций в микросателлитных локусах (параметры модели: доля многошаговых

мутаций – 10%, средний размер шага – три повтора) значимый избыток гетерозигот, связанный с недавним снижением аллельного разнообразия вследствие сокращения численности популяции, был выявлен в выборках из водоемов Восточной Камчатки и Чукотки (за исключением выборки из нижнего течения р. Камчатка), а также из рек Палана и Охота.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ряде выборок были обнаружены отклонения от равновесия Харди–Вайнберга по некоторым локусам, во всех положительных тестах выявлен значимый дефицит гетерозигот. Причинами несоблюдения равновесия могут быть как генетические и демографические факторы, такие как отбор, летальные мутации, миграция генов, инбридинг, асортативное скрещивание, эффект Валунда, нуль-аллели, так и случайные и методические погрешности. Наиболее вероятными причинами выявленного неравновесия в смешанных выборках из устьев крупных озерно-речных систем, на наш взгляд, являются эффект Валунда и действие отбора по ряду неравновесных локусов. Эффект Валунда, как показано Животовским [20], может приводить к высоким оценкам F_{IS} при больших значениях коэффициента миграции m и F_{ST} , если выборка взята, скажем, из смешанного улова на путях миграции или нагула лососевых. Как хорошо известно, нерке свойственна выраженная внутривидовая дифференциация на уровне субпопуляций или субизолятов, темпоральных или экологических рас, а также экотипов различных нерестилищ, зачастую превышающая различия между отдельными локальными (географическими) популяциями. Поэтому выборки, взятые в устьях крупных рек, в бассейне которых имеется множество притоков и нерестовых озер, с высокой вероятностью могут быть гетерогенны. В свою очередь, действие направленного отбора по локусам *MHC2_190v2*, *MHC2_251v2* и *GPH-414* выявлено в бассейне р. Камчатка [8], по *ZNF-61* ($p < 0.05$) – в бассейне р. Большая при анализе выборок из двух ее крупных притоков, рек Быстрая и Озерная, что подтверждает наши предположения о причинах выявленных отклонений по данным локусам.

В целом генетическая дифференциация нерки на рассматриваемой части ареала хорошо согласуется с пространственно-географической структурой данного вида. По обеим бескорневым дендрограммам отчетливо заметно деление на северную и южную группы (см. рис. 4). По первому дереву, построенному с использованием как нейтральных, так и селективных SNP, популяции, приуроченные к водоемам, расположенным на границе ареала (Чукотка, Охотский район), а также нерка р. Палана, значительно дифференциро-

ваны от так называемых популяционных ядер данного вида – крупнейших популяционных комплексов азиатского побережья, рек Озерная и Камчатка, и группировки многочисленных второстепенных стад озерно-речных систем Корякского нагорья. С помощью кластеризации в программе STRUCTURE 2.3.4 были идентифицированы пять групп популяций, среди которых самостоятельно дифференцируются выборки из рек Палана и Охота, а также группы популяций Юго-Западной Камчатки, Северо-Восточной Камчатки и Чукотки и бассейна р. Камчатка. Результаты кластеризации хорошо коррелируют со структурой дендрограммы, построенной по нейтральным локусам, и с оценками, полученными с помощью иерархического анализа молекулярной изменчивости (AMOVA).

Обращает на себя внимание высокая степень дивергенции популяций рек Палана и Охота. Что касается первой из них, то наиболее вероятным объяснением этому может быть действие дифференцирующего отбора по некоторым локусам SNP, обусловленное как особенностями географического расположения данной реки (субпериферия ареала), так и особенностями биологии паланской нерки. Река впадает в Охотское море на севере п-ова Камчатка, на уровне 59° с.ш., поэтому молодь нерки вынуждена совершать протяженную миграцию вдоль побережья Западной Камчатки для выхода на нагул в Тихий океан, что отражается на ее биологических показателях и динамике численности [21]. Кроме того, к особенностям данной популяции можно отнести тот факт, что воспроизводство и нагул молоди нерки до ската в море сосредоточены практически полностью в бассейне оз. Паланского, где она проводит в подавляющем большинстве случаев два года [21], т.е. всю паланскую нерку можно отнести к озерному экотипу [22]. Перечисленные экологические особенности данной популяции с высокой долей вероятности дают почву для возникновения локальных адаптаций в условиях отсутствия интенсивного потока генов из соседних популяций, высокой N_e (нерка р. Палана занимает третье–четвертое место по численности среди всех азиатских стад) и значительной гомогенности среды обитания в оз. Паланском. Некоторые из анализируемых локусов SNP, большинство из которых локализованы в функциональных генах, гипотетически могут участвовать (непосредственно или в результате фонового отбора или эффекта генетического попутчика) в их формировании. Однако на данном этапе трудно предположить, какие именно локусы и какие механизмы вовлечены в адаптивные процессы, протекающие в этой популяции. По результатам дисперсионного анализа по каждому из локусов (Locus-by-locus AMOVA) удалось установить, что за дифференциацию нерки р. Палана от других западно-

камчатских популяций отвечают 24 локуса, среди которых 12 с максимальными значениями F_{ST} ($>10\%$); от остальных выборок нерка р. Палана отличается по 17 локусам, из которых 13 имели оценки $F_{ST} > 10\%$. Действие направленного отбора по локусам *MHC2_251v2* и *GPH-414* в популяции р. Палана выявлено по результатам детекции локусов-кандидатов в различных комбинациях выборок ($p < 0.01$).

По другой версии причиной выраженных отличий выборки из р. Палана могут быть снижение генетического разнообразия и смещение генных частот вследствие относительно недавнего сокращения эффективной численности популяции. Однако существенного снижения аллельного разнообразия относительно средней гетерозиготности, наблюдаемого в популяциях, прошедших через бутылочное горлышко, в выборке из р. Палана по полученным оценкам не отмечается (см. табл. 2). Тесты на неравновесие между мутациями и дрейфом, проявляющееся в эксцессе гетерозиготности, были положительны во всех проанализированных выборках, включая данную. Кроме того, сдвиги в распределении частот аллелей локусов SNP, свидетельствующие в пользу относительно недавнего прохождения популяции через бутылочное горлышко, также были выявлены во всех северных популяциях, включая паланскую. Однако, на наш взгляд, обнаруженные следы сокращения численности обследованных популяций можно отнести к более раннему периоду их существования, нежели к принятому исследователями отрезку времени в течение нескольких десятков поколений [23]. Например, для консервативных маркеров, таких как SNP или аллозимы, данные тесты способны выявлять гораздо более древние события. На восстановление аллельного разнообразия локусов SNP уходит существенно больше времени, чем на те же процессы в микросателлитных локусах. Так, окончание последнего в позднем плейстоцене Висконсинского оледенения характеризовалось существенным потеплением и наступлением послеледниковой (голоценовой) трансгрессии. Ее начало совпало с относительно быстрым подъемом уровня моря, продолжавшимся до среднего голоцена [25]. Именно в этот период, после отступления ледника, сохранившиеся популяции расселялись на освобождавшиеся территории. Молодые популяции, происходящие от ограниченного числа вселенцев, сильнее реагируют на критические изменения внешней среды и характеризуются неустойчивой динамикой численности. Возможно, именно эти события, т.е. скорее эффект основателя нежели бутылочное горлышко, и запечатлены в полученных смещенных распределениях частот аллелей локусов SNP.

Наши результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе сведениями об изменчивости тех же локусов SNP практически на всем ареале данного вида [9]. Ранее в работе Хабичта с соавт. [9] была реконструирована полностью аналогичная пространственно-генетическая организация нерки десяти крупнейших озерно-речных систем Камчатки. Так, западно-камчатские популяции, включая выборку из р. Тигиль (северо-западное побережье Камчатки), формировали общую кладу, в то время как восточно-камчатские популяции разделились на два кластера, первый из которых представлен популяциями из бассейна р. Камчатка, второй – группой выборок из рек, впадающих в Олоторский залив. Нерка р. Палана, как и по нашим данным, была в наибольшей степени дистанцирована от остальных камчатских популяций и попала в общую кладу с неркой западного побережья зал. Аляска [9].

Несколько иная картина подразделенности исследованных популяций нерки на обследованной части ареала была получена нами по оценкам изменчивости шести микросателлитных локусов ДНК. На соответствующей дендрограмме, а также по результатам визуализации матрицы парных F_{ST} , выделяются группы популяций восточного и западного побережья Камчатки, при этом нерка р. Палана попадает в кластер западно-камчатских популяций. По данным анализа полиморфизма контрольного региона мтДНК паланская нерка также не отличалась от других камчатских популяций по частотам двух массовых гаплотипов, которые были распределены более или менее равномерно во всех выборках западного и восточного побережий полуострова, за исключением выборок из бассейна р. Камчатка [26]. В этом контексте отметим, что несовпадения в топологии дендрограмм при исследовании изменчивости маркеров из различных кластеров генома, т.е. локализованных в кодирующих и некодирующих последовательностях, следуют *a priori*. Так, большинство из используемых в работе аннотированных SNP [6, 9–11] локализованы в интронах или экзонах структурных генов или же были выявлены в различных экспрессирующихся последовательностях (EST), т.е. с определенной долей вероятности могут быть вовлечены в формирование локальных адаптаций в популяциях данного вида, в то время как микросателлитные локусы принадлежат к семейству тандемно повторяющихся последовательностей ядерной ДНК и предположительно селективно нейтральны. Очевидно, что селективно нейтральные маркеры выявляют нейтральную популяционную структуру вида, обусловленную в первую очередь историческими процессами преобразования его ареала и демографическими факторами, а также мутационным процессом, чьи эффекты могут ощутимо проявляться в случае высокополиморфных микроса-

теллитных локусов. Таким образом, по оценкам нейтральной изменчивости ядерной и митохондриальной ДНК нерке р. Палана свойствен умеренный уровень дифференциации в сравнении с другими камчатскими популяциями; кроме того, ее с уверенностью можно отнести к западно-камчатскому комплексу. По данным анализа вариабельности 14 микросателлитных локусов в популяциях нерки Камчатки и Чукотки [27], нерка р. Палана также была удалена от основной группы выборок Западной Камчатки и входила вместе с неркой р. Тигиль в группу популяций юго-восточного побережья полуострова. Сходство популяций из отдаленных частей ареала, которое прослеживается по нейтральным маркерам, свидетельствует скорее об общности их происхождения, нежели о конвергентных адаптациях. Однако здесь не все так просто, и интерпретация результатов существенно зависит от свойств конкретных локусов, включенных в анализ. Так, некоторые из микросателлитных локусов могут быть сцеплены с близлежащими функциональными генами или же известны примеры, когда аллель определенной длины мог влиять на экспрессию соседнего гена [28]. Обращает на себя внимание, что генетическое сходство паланской популяции и выборок юго-восточного побережья Камчатки коррелирует с общими экологическими и биологическими особенностями данных стад. По аналогии с р. Паланой практически вся молодежь нерки из водоемов Юго-Восточной Камчатки (рр. Лиственничная, Паратунка, Авача, Саранная) воспроизводится и нагуливается в озерах, где проводит 2–3 года [29]. Вполне возможно, что основную роль в формировании генетического своеобразия данных популяций играет естественный отбор. Не случайно некоторые из используемых Бичемом с соавт. локусов, так же как и селективные SNP, удовлетворительно разделяли экотипы различных нерестилищ нерки в пределах бассейна одного озера и практически не дифференцировали сезонные расы или локальные субпопуляции крупных озерно-речных систем, степень изоляции между которыми на первый взгляд гораздо выше.

Вероятно в популяции р. Охота наблюдается несколько иная картина: существенное снижение генетического разнообразия в данной выборке скорее свидетельствует о недавнем сокращении численности, нежели о влиянии направленного отбора. Вероятность бутылочного горлышка в популяции нерки р. Охота подтверждается тестами на неравновесие между дрейфом и мутациями в микросателлитных локусах. Известно, что численность охотской нерки подвержена довольно резким колебаниям, связанным с условиями ее естественного воспроизводства [30]. Так, в 1968 г. в Уегинские озера в бассейне р. Охота на нерест смогли пройти лишь 300 экз. нерки, при средней

численности в остальные годы от 5–6 тыс. до 1.5 млн экз. [30]. Столь недавние события, вероятно, успешно обнаруживаются тестами на проходимость через горлышко бутылки по высокополиморфным микросателлитным локусам и не выявляются по распределениям генотипов таких консервативных биаллельных маркеров, как SNP. Отмеченное ранее смещение частот гаплотипов мтДНК, а также большой процент редких гаплотипических вариантов в выборке из р. Охота в сравнении с соседним речным бассейном, р. Ола, расположенным в том же регионе [19], вероятно, также могут быть обусловлены дрейфом генов вследствие значительных колебаний численности рассматриваемой популяции.

Тесты на нейтральность не выявили действия отбора ни по одному из локусов SNP в данной выборке. Однако среди локусов, отделяющих выборку р. Охота от остальных (суммарно девять локусов, из них пять с $F_{ST} > 10\%$), по результатам Locus-by-locus AMOVA был потенциально селективный в ряде локальностей *STC-410* [7, 31]. Вероятно, высокая степень дивергенции популяций рек Палана и Охота, расположенных на периферии ареала нерки, может быть обусловлена обоюдным вкладом адаптивных (локальный отбор) и демографических (дрейф генов, снижение эффективной численности) процессов, имеющих место в данных популяциях.

Авторы выражают искреннюю признательность всем сотрудникам лаборатории экологической геномики факультета гидробиологии и рыболовства Университета штата Вашингтон, к.б.н. М.В. Шитовой (ИОГен РАН) и к.б.н. П.К. Афанасьеву (ВНИРО) за помощь в лабораторной обработке материала, а также сотрудникам ВНИРО, КамчатНИРО, Чукотского отделения ТИНРО и МагаданНИРО, принявшим участие в сборе материала.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-00668А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Салменкова Е.А.* Молекулярно-генетические основы процессов адаптации и подходы к их анализу // Генетика. 2013. Т. 49. № 1. С. 94–102.
2. *Fraser D.I., Weir L.K., Bernatchez L. et al.* Extent and scale of local adaptation in salmonid: review and meta-analysis // Heredity. 2011. V. 106. P. 406–420.
3. *Ackerman M.W., Seeb L.W., Seeb J.E., Templin W.D.* Landscape heterogeneity and local adaptation define the spatial genetic structure of Pacific salmon in a pristine environment // Conserv. Genetics. 2013. V. 14(2). P. 483–498.
4. *Vasemagi A., Primmer C.R.* Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies // Mol. Ecol. 2005. V. 14. P. 3623–3642.

5. Nielsen E.E., Hemmer-Hansen J., Larsen P.F., Bekkevold D. Population genomics of marine fishes: identifying adaptive variation in space and time // *Mol. Ecol.* 2009. V. 18. P. 3128–3150.
6. Хрусталева А.М., Гриценко О.Ф., Кловач Н.В. Полиморфизм по однонуклеотидным заменам (SNP) в популяциях нерки *Oncorhynchus nerka* п-ова Камчатка // *Генетика*. 2013. Т. 49. № 11. С. 1322–1336.
7. Хрусталева А.М., Кловач Н.В., Гриценко О.Ф., Сиб Д.Е. Внутри- и межпопуляционная изменчивость нерки *Oncorhynchus nerka* юго-западного побережья Камчатки по данным однонуклеотидного полиморфизма // *Генетика*. 2014. Т. 50. № 7. С. 840–852.
8. Хрусталева А.М., Кловач Н.В., Ведищева Е.В., Сиб Д.Е. Генетическая дифференциация нерки *Oncorhynchus nerka* бассейна р. Камчатка и озерно-речных систем западного побережья Берингова моря по данным анализа локусов однонуклеотидного полиморфизма // *Генетика*. 2015. Т. 51. № 10. С. 1141–1153.
9. Habicht C., Seeb L.W., Myers K.W. et al. Summer–fall distribution of stocks of Immature sockeye salmon in the Bering Sea as revealed by single-nucleotide polymorphisms // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 2010. V. 139(4). P. 1171–1191.
10. Smith C.T., Elfstrom C.M., Seeb J.E., Seeb L.W. Use of sequence data from rainbow trout and Atlantic salmon for SNP detection in Pacific salmon // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 4193–4203.
11. Elfstrom C.M., Smith C.T., Seeb J.E. Thirty-two single nucleotide polymorphism markers for high-throughput genotyping of sockeye salmon // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. V. 6(4). P. 1255–1259.
12. Seeb J.E., Pascal C.E., Ramakrishnan R., Seeb L.W. SNP genotyping by the 5'-nuclease reaction: advances in high throughput genotyping with non-model organisms // *Methods in Molecular Biology, Single Nucleotide Polymorphisms* / Ed. Komar A. Humana Press, 2009. P. 277–292.
13. Хрусталева А.М. Комплексный метод дифференциации нерки (*Oncorhynchus nerka*) азиатских стад. М.: Изд-во ВНИРО, 2007. 165 с.
14. Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // *Mol. Ecol. Notes*. 2004. V. 4. P. 535–538.
15. Chapuis M.P., Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24(3). P. 621–631.
16. Felsenstein J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2) // *Cladistics*. 1989. V. 5. P. 164–166.
17. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000. V. 155. № 2. P. 945–959.
18. Earl D.A., Von Holdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Conserv. Genet. Res.* 2012. V. 4(2) P. 359–361.
19. Хрусталева А.М. Филогеография азиатской нерки *Oncorhynchus nerka* по данным изменчивости митохондриальных локусов ОНП: анализ сценариев послеледникового расселения вида на азиатском побережье Тихого океана // *Изв. ТИНРО*. 2016. Т. 186. С. 93–106.
20. Zhivotovsky L.A. Relationships between Wright's F_{ST} and F_{IS} statistics in a context of Wahlund effect // *J. Hered.* 2015. V. 106(3). P. 306–309.
21. Бугаев В.Ф., Миловская Л.В., Ленская Е.В. и др. Исследования нерки *Oncorhynchus nerka* оз. Паланского в 1990–2001 гг. (северо-западная Камчатка) // *Изв. ТИНРО*. 2002. Т. 130. С. 777–791.
22. Wood C.C., Riddell B.E., Rutherford D.T. Alternative juvenile life histories of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) and their contribution to production in the Stikine River, northern British Columbia // *Sockeye Salmon (Oncorhynchus nerka) Population Biology and Future Management* / Eds Smith H.D., Margolis L., Wood C.C. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci., 1987. P. 12–21.
23. Cristescu R., Sherwin W.B., Handasyde K. et al. Detecting bottlenecks using BOTTLENECK 1.2.02 in wild populations: the importance of the microsatellite structure // *Conserv. Genetics*. 2010. V. 11. P. 1043–1049.
24. Luikart G., Allendorf F.W., Cornuet J.M. et al. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks // *J. Hered.* 1998. V. 89(3). P. 238–247.
25. Черешнев И.А. Биогеография пресноводных рыб Дальнего Востока России. Владивосток: Дальнаука, 1998. 131 с.
26. Хрусталева А.М., Волков А.А., Распоргуев С.М., Углова Т.Ю. Реконструкция послеледникового расселения азиатской нерки *Oncorhynchus nerka* // *Труды ВНИРО*. 2016. Т. 161. С. 65–77.
27. Beacham T.D., Varnavskaya N.V., McIntosh B., MacConnachie C. Population structure of sockeye salmon from Russia determined with microsatellite DNA variation // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 2006. V. 135. P. 97–109.
28. Streelman J.T., Kocher T.D. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia // *Physiol. Genomics*. 2002. V. 9(1). P. 1–4.
29. Бугаев В.Ф., Бугаев А.В., Дубынин В.А. Возрастной состав промысловых стад нерки *Oncorhynchus nerka* в водоемах восточного побережья Камчатки и смежных территорий // *Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей / Докл. VII научн. конф. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс, 2006. С. 15–40.*
30. Никулин О.А. Воспроизводство красной *Oncorhynchus nerka* (Walb.) в бассейне р. Охоты // *Труды ВНИРО*. 1975. Т. CVI. С. 97–105.
31. Gomez-Uchida D., Seeb J.E., Smith M.J. et al. Single nucleotide polymorphisms unravel hierarchical divergence and signatures of selection among Alaskan sockeye salmon populations // *BMC Evol. Biology*. 2011. V. 11. 48 p. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/11/48>.

Genetic Variability and Population Structure of Sockeye Salmon from the Asian Coast of Pacific Ocean

A. M. Khrustaleva^{a,*}, N. V. Klovach^a, and J. E. Seeb^b

^aAll-Russia Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 107140 Russia

^bSchool of Aquatic and Fishery Sciences, University of Washington, Seattle, WA 355020, United States of America

*e-mail: mailfed@mail.ru

Variability of six microsatellite loci and 45 single nucleotide polymorphism (SNP) loci was analyzed in 17 samples of sockeye salmon from 10 major spawning watersheds on the Asian coast of the Pacific Ocean. On the basis of the analysis of SNP loci variability of sockeye salmon in the examined part of the range, five population groups were identified, including local stocks from the Palana, Okhota, and Kamchatka rivers, as well as the population groups of Southwestern Kamchatka, and Northeastern Kamchatka and Chukotka. Rather different -pattern of - samples differentiation was obtained by estimating variability of six microsatellite DNA loci. Regional complexes of the eastern and western coasts of Kamchatka were identified. Moreover, sockeye salmon from the Palana River fell into the cluster of Western Kamchatka populations, while the population from the Okhota River and Meynypilgin lake–river system (Chukotka), confined to the subperiphery of the range, where the most differentiated from the others. The possible reasons for the discrepancies and high divergence of the Palana River and the Okhota River sockeye salmon populations, inferred from the SNP markers analysis, are discussed.

Keywords: sockeye salmon, single nucleotide polymorphism (SNP), microsatellites, population differentiation, population structure.