

ПОПУЛЯЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 575.174; 597.553.2

**О СОЗДАНИИ БАЗЫ ДНК-ДАНЫХ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ
ВОСПРОИЗВОДСТВА, ИДЕНТИФИКАЦИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
ПОПУЛЯЦИЙ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕЙ
НА ПРИМЕРЕ КЕТЫ о. ИТУРУП**

© 2008 г. Л.А. Животовский¹, К.И. Афанасьев¹, Г.И. Рубцова¹,
М.В. Шитова¹, Т.В. Малинина¹, Т.А. Ракицкая¹, В.Д. Прохоровская¹,
Е.А. Салменкова¹, Л.К. Федорова², С.И. Борзов³, В.П. Погодин⁴

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

2 – Отдел рыбоводства ЗАО «Гидрострой», Южно-Сахалинск, Сахалин

3 – Рейдовая научно-исследовательская станция, ФГУ «Сахалинрыбвод», Итуруп

4 – Курильский лососевый рыбозаводный завод, Итуруп

Поступила в редакцию 26.09.2007 г.

Для решения проблем устойчивого воспроизводства лососей, идентификации стад и экологической сертификации важно знать наследственное своеобразие популяций. Для этого необходимо создать базу данных, содержащую генетические характеристики рыб исследуемых группировок. Среди возникающих при этом задач одна из ведущих – это разработка генетических методов, способных отличить одни популяции от других. Для ее решения следует ответить на следующие основные вопросы: какие генетические маркеры использовать, позволяют ли эти маркеры различать географически близкие стада и популяционные компоненты стад, как собирать биологический материал для такой базы данных? Исследовав, в качестве примера, стада кеты (*Oncorhynchus keta*) бассейнов рек Рейдовая и Курилка о. Итуруп в течение всего нерестового хода, мы показали, что они хорошо разделяются микросателлитными маркерами. В свою очередь, они отличаются от других стад кеты о. Итуруп. Сформулированы требования к популяционным базам ДНК-данных по тихоокеанским лососям в целях выявления генетической дифференциации. А именно:

- микросателлиты являются удобными генетическими маркерами для различения популяций;
- выборки должны браться как на естественных нерестовых участках, так и забойках рыбозаводных заводов, с учетом пространственной и временной структуры стада;
- каждая точка сбора должна характеризоваться несколькими выборками (по крайней мере, в начале, середине и конце руниного хода),
- объем каждой выборки должен быть не меньше 50-100 особей;
- сбор образцов для генотипирования важно совмещать с биологическим анализом исследуемых рыб – определением пола, возраста и других характеристик.

Для решения проблем воспроизводства лососей, идентификации стад и экологической сертификации важно знать наследственное своеобразие популяций. Одним из требований, предъявляемых к оцениваемым объектам и процедурам рыболовства, является знание генетических особенностей исследуемых стад и умение различать их популяционные компоненты. Это диктует необходимость создания баз данных, содержащих генетические характеристики рыб различных группировок.

Среди задач с использованием таких баз данных, одна из ведущих – это разработка методов, способных отличить одни популяции от других. Для достижения этой цели следует ответить на следующие основные вопросы. Первый: какие генетические маркеры использовать? Второй: позволяют ли эти маркеры различать географически близкие стада и популяционные компоненты стад? Третий: как собирать биологический материал для такой базы данных? В настоящее время в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН создается база ДНК-данных по тихоокеанским лососям, в частности по кете, на примере которой мы рассматриваем эти вопросы.

Кета (*Oncorhynchus keta* W.) широко распространена в северной части Тихого океана, а среди лососей Российского Дальнего Востока занимает второе место после горбуши по мощности подходов. Пополнение запасов кеты идет как путем естественного воспроизводства, так и во многом за счет искусственного разведения на лососевых рыбопроизводных заводах (ЛРЗ). Наиболее впечатляющим примером успехов искусственного воспроизводства является созданное на о. Хоккайдо искусственное стадо кеты, промысловый возврат которого превышает 200 тыс. т, т.е. больше чем всех вылавливаемых Россией лососей. В последние годы, благодаря прежде всего изменениям условий хозяйствования, все больший интерес к разведению кеты проявляется и в России. Рыбоводные заводы, предпочитавшие ранее в большей степени заниматься разведением горбуши, прилагают усилия по восстановлению упавшей численности своих стад кеты, а в некоторых случаях по формированию стад, ранее отсутствовавших или крайне малочисленных.

Сегодня в связи с увеличением масштабов разведения кеты встают проблемы генетической дифференциации стад не только различных регионов, но и популяций, воспроизводимых в пределах одного региона, в особенности в бассейнах смежных рек. Поэтому по инициативе ЗАО «Гидрострой» в 2006 г. нами были исследованы два стада кеты о. Итуруп, разводимые на Рейдовом и Курильском рыбозаводах, с целью оценить степень их генетической самостоятельности. Кроме того, Курильский ЛРЗ ранее выпускал преимущественно горбушу, но с 2003 г. на нем стали увеличивать объемы разведения кеты; поэтому важно было выяснить, будут ли рыбы первого возврата от этой закладки (возраста 2+), отловленные в р. Курилке, генетически соответствовать стаду кеты р. Курилка.

В связи с этими конкретными проблемами встала задача выбора наиболее подходящих генетических маркеров, удобных в работе и позволяющих различать стада кеты соседних речных бассейнов, а также основанная на ней практически важная задача разработки подходов и принципов генетической дифференциации стад кеты и других видов тихоокеанских лососей по этим маркерам на примере указанных двух основных стад кеты, а также кеты некоторых других рек Итурупа.

Аллозимные и микросателлитные маркеры

На сегодня имеются две основных группы полиморфных генетических маркеров: биохимические маркеры и ДНК-маркеры. Первые характеризуют наследственный полиморфизм белков, в основном ферментов (аллозимов, от англ. *allozyme*), вторые – полиморфизм на уровне ДНК. Изучение аллозимного полиморфизма получило широкое распространение с конца 60-х вплоть до конца 90-х годов и сейчас еще нередко используются в популяционных исследованиях, в том числе тихоокеанских лососей (Алтухов и др., 1997; Seeb et al., 2004; Варнавская, 2006).

Полиморфизм ДНК стал инструментом популяционных исследований с середины 90-х годов; у рыб он исследуется сейчас, в основном, через анализ митохондриальной ДНК (мтДНК) и микросателлитных локусов ядерной ДНК. ДНК митохондрий представляет собой малую часть общего генома организма – неядерный геном, передающийся по материнской линии. Вследствие отсутствия рекомбинации типы мтДНК передаются неизменными (за вычетом вновь возникающих мутаций) и потому являются хорошими маркерами генеалогии материнских линий при искусственном разведении, а также родства популяций. Однако для целей дифференциации популяций и их идентификации митохондриальная ДНК обладает слабой разрешающей способностью из-за того, что представляет лишь малую часть генома, а в популяционно-генетическом плане является лишь одним локусом из-за отсутствия рекомбинации. Важно указать также на развивающиеся методы выявления «точковых», нуклеотидных замен (т.н. мононуклеотидного полиморфизма, или SNP – от англ. *Single Nucleotide Polymorphism*). В геноме организмов имеются миллионы таких замен и в скором будущем следует ожидать новых технологий, позволяющих выявлять в массовом количестве SNP'ы у лососей (Springer, 2006). Однако, проводя параллели с логикой использования ДНК-маркеров для изучения генетической структуры популяций человека (Животовский, 2006), можно утверждать, что микросателлиты являются более перспективными маркерами для целей дифференциации.

Микросателлит (от англ. *microsatellite*) представляет собой небольшой фрагмент ДНК, в котором есть несколько следующих друг за другом коротких идентичных повторов; повтор состоит из нескольких пар нуклеотидов (например, АТТС). Аллели данного микросателлитного локуса отличаются друг от друга в

основном разным числом повторов; например, один аллель может иметь три повтора (АТТС АТТС АТТС), другой – пять (АТТС АТТС АТТС АТТС АТТС) и т.д. Микросателлиты высокополиморфны, нередко с десятками аллелей в каждом локусе. Высокие темпы мутирования в микросателлитных локусах приводят к накоплению популяционно-специфических мутаций, что позволяет проводить детальный анализ популяционной структуры. Для типирования микросателлитов требуется небольшое количество ДНК, которое при необходимости можно экстрагировать даже из деградированного биологического материала. Нередко микросателлитный маркер обозначают как *STR-локус* (или просто *STR*) – от английского *Short Tandem Repeats*, или же *SSR* – *Simple Sequence Repeats*. Свойства микросателлитных маркеров и некоторые методы их популяционно-генетического анализа даны в обзоре Л.А. Животовского (2006). Основные различия между аллозимами и микросателлитами приведены в таблице 1.

Таблица 1. Различия между микросателлитными и аллозимными маркерами.

Table 1. The difference between microsatellite and allozyme markers.

Характеристика	Аллозимы	Микросателлиты
Маркируемые участки генома	белок-кодирующие последовательности (экзоны)	любые фрагменты ДНК; обычно – некодирующие участки генов (интроны) и межгенные области
Функциональная нагруженность	ферментативные реакции	обычно – отсутствие явной функции
Биологический образец для исследования	свежие мышцы, печень и др. ткани; взятие проб портит товарный вид рыбы; не допускает анализа залежалых тушек	любая ткань; достаточно края плавника без нарушения товарного вида; теоретически возможен анализ ДНК чешуи со старых чешуйных книжек
Метод фиксации образца и требование к его транспортировке	замораживание в целях сохранения активности ферментов	фиксация в 96%-ом этаноле; охлаждение не обязательно
Количество доступных для анализа локусов	не более нескольких десятков	потенциально – сотни и тысячи
Степень полиморфизма (число аллелей на локус)	обычно 2, реже 3–4 частых аллеля; больше 4-х – редко	обычно 5–15; нередко – несколько десятков аллелей

Изучение микросателлитной изменчивости кеты только начинается. Лишь недавно был отработан набор микросателлитных маркеров (Bucholz et al., 2001) и изучены популяции отдельных рек Северной Америки и Китая (Scribner et al., 1998; Chen et al., 2005; Yoon et al., 2005; Small et al., 2006). В 2003–2005 гг. нами было проведено исследование кеты Сахалино-Курильского региона (Афанасьев и др., 2006, 2007; Рубцова и др., 2007).

ДНК-дифференциация кеты Рейдового и Курильского ЛРЗ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучали дифференцирующую способность аллозимных и микросателлитных маркеров у кеты бассейнов рек Рейдовая и Курилка о. Итуруп, которая в основном поддерживается искусственным разведением на Рейдовом

и Курильском рыболовных заводах (рис. 1). Мы провели подробный генетический и биологический мониторинг этих двух стад в течение всего рунного хода осенью 2006 г. Выборки по 100 рыб брали одновременно с проведением плановых биоанализов производителей на этих заводах (исключением явились две выборки с обеих забоек Рейдового ЛРЗ, №4 и №5 на рисунке 2, взятые в один и тот же день; в каждой из них было по 50 рыб).

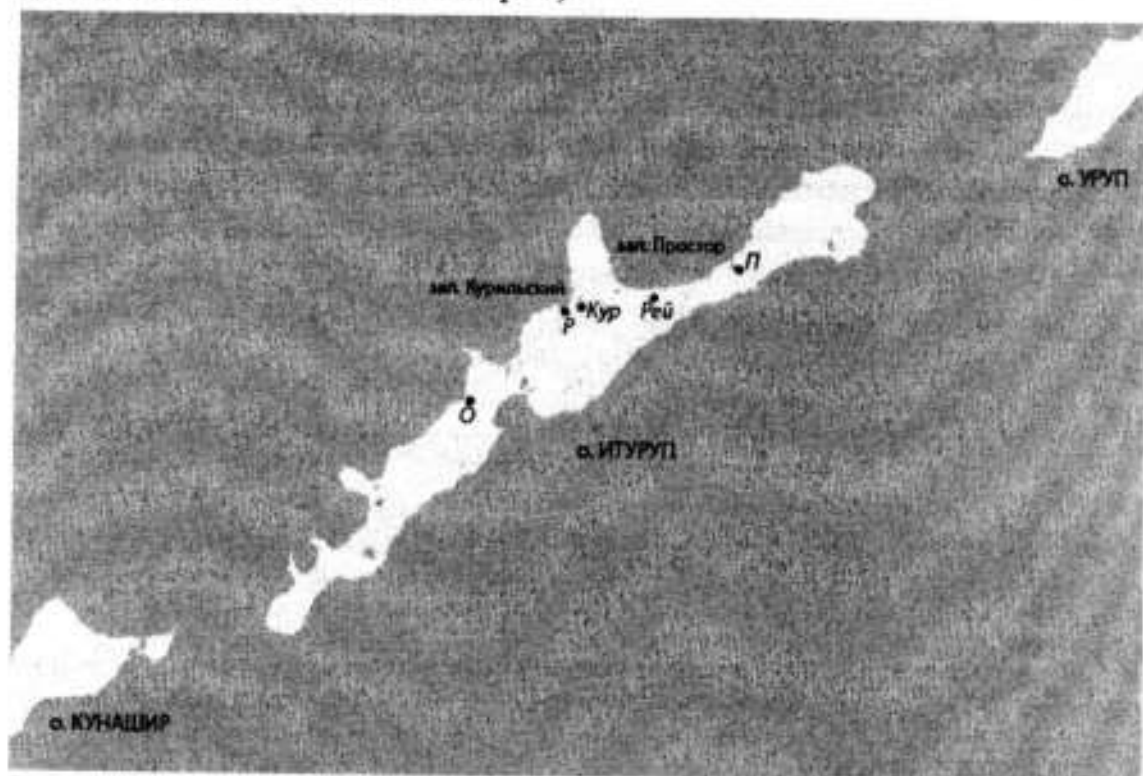


Рис. 1. Места сбора биологических проб: *Рей* – бассейн реки Рейдовая (впадает в зал. Простор); *П* – руч. Порожистый, впадает в оз. Сопочное, соединенное протокой с зал. Простор; *Кур* – бассейн р. Курилка (впадает в зал. Курильский); *Р* – р. Рыбачья (впадает в зал. Курильский); *О* – р. Осенняя.

Fig. 1. Location of sampling: *Рей* – the basin of Reidovaya River (runs into Prostor Bay); *П* – Porozhistiy Creek (runs into Sopochnoe Lake connected to Prostor Bay); *Кур* – the basin of Kurilka River (runs into Kurilskiy Bay); *Р* – Rybatskaya River (runs into Kurilskiy Bay); *О* – Osenniy River.

Выборки были распределены во времени с учетом длительности нерестового хода, полностью покрывая основную динамику промыслового изъятия рыбы в заливах и время закладки икры на инкубацию на ЛРЗ (рис. 2; табл. 2). Выборки брали как непосредственно на забойках ЛРЗ, так и в устьях базовых рек, а также две выборки из двух притоков р. Рейдовая: р. Аргунь и руч. Крохалиный (по 50 экз.). Кроме того, в этом же сезоне исследовали некоторые естественные популяции кеты о. Итуруп (рис. 1): из руч. Порожистый, впадающего в оз. Сопочное, соединенное протокой с заливом Простор (50 рыб), р. Рыбачья (Курильский залив; 100 рыб) и р. Осенняя (бухта Осенняя; всего 17 экз. из-за практически полного отсутствия рыбы в реке на момент взятия проб).

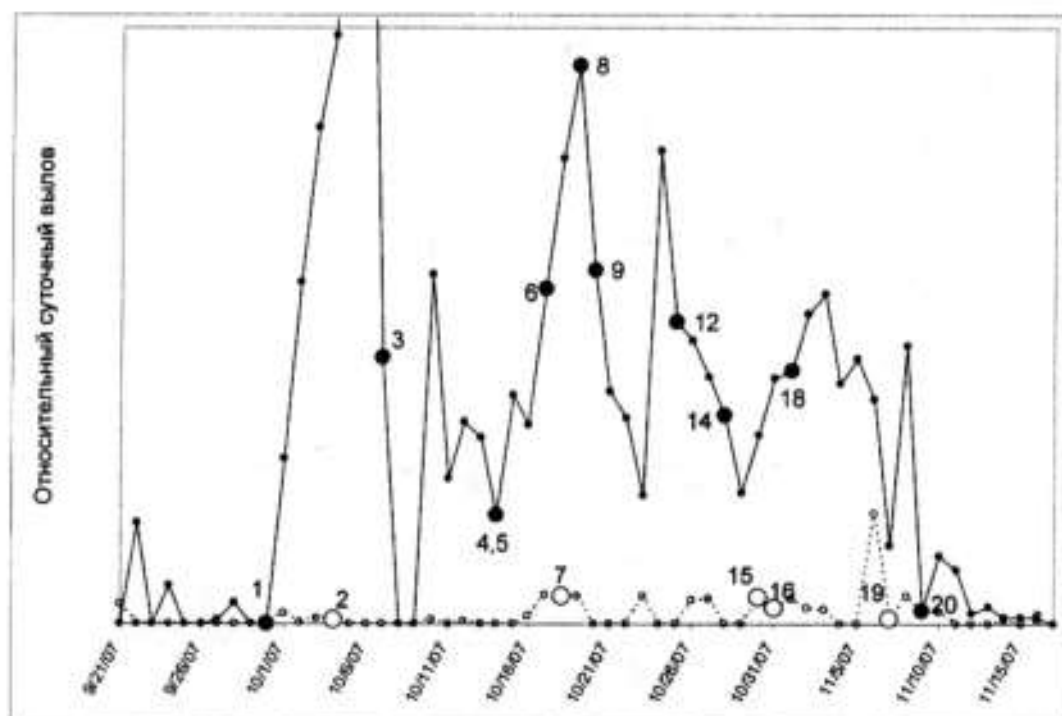


Рис. 2. Время взятия проб в системе р. Рейдовая (темные кружки) и р. Курилка (светлые кружки) на фоне динамики уловов кеты в соответствующих заливах: зал. Простор (сплошная линия) и зал. Курильском (штриховая линия).

Примечание: Пробы пронумерованы в порядке взятия выборок в ходе работы. Не указанные на рисунке номера 10, 11 и 17 отвечают выборкам, взятым из других бассейнов Итурупа (соответственно, из р. Рыбачская, руч. Порожистый оз. Сопочное, р. Осенняя). Все эти 19 выборок исследовали по микросателлитным маркерам; из них 12 выборок (8 – из Рейдового и 4 – из Курильского стад кеты) были дополнительно генотипированы по аллозимам.

Fig. 2. Dates of sampling from chum salmon stocks of two river systems, Reidovaya (black circles) and Kurilka (open circles), indicated on the catch dynamics in the corresponding bays: the Prostor Bay (solid line) and the Kuril'skiy Bay (dashed line).

Note: Population samples are ordered according to the date of sampling. Not shown are samples number 10, 11, and 17 that were taken from other locations in the Iturup Island: Rybatskaya River, Porozhistiy Creek (Lake of Sopochnoe), and Osennjaya River, respectively. All these 19 samples were analyzed with microsatellites, twelve of those were additionally genotyped with allozymes (eight samples from Reidovaya River and four samples from Kurilka River).

Для анализа микросателлитных локусов отрезали край плавника (как правило – грудного), а для аллозимов – кусочек мышцы. Генотипирование биологических образцов проводили по методикам, описанным в статьях К.И. Афанасьева и др. (2006, 2007), Е.А. Салменковой и др. (2007), Г.А. Рубцовой и др. (2007). Микросателлиты анализировали во всех 19-ти выборках у первых 50-ти рыб; в 12-ти из них (из бассейнов рек Рейдовой и Курилки) образцы дополнительно типировали по аллозимам, в этих же 12-ти выборках собирали образцы чешуи для определения возраста. Статистический анализ данных вели согласно руководству Б.С. Вейра (Weir, 1996) с использованием компьютерных программ GDA (Lewis, Zaykin, 2001) и SPSS (SPSS for Windows, 2002).

Таблица 2. Коды, места и даты взятия выборок кеты.

Table 2. Labels, locations and dates of sampling chum salmon.

Код	Место взятия выборок и номера проб	Дата
1	р. Рейдовая, устье	30.09.2006
2	забойка Курильского ЛРЗ	04.10.2006
3	р. Рейдовая, устье	07.10.2006
4	малая забойка Рейдового ЛРЗ	14.10.2006
5	большая забойка Рейдового ЛРЗ	14.10.2006
6	р. Рейдовая, устье	17.10.2006
7	забойка Курильского ЛРЗ	18.10.2006
8	руч. Крохалиный (приток Рейдовой)	19.10.2006
9	речка Аргунь (приток Рейдовой)	20.10.2006
10	р. Рыбачья	19.10.2006
11	ручей Порожистый (оз. Сопочное)	24.10.2006
12	р. Рейдовая, устье	25.10.2006
14	б.забойка Рейдового ЛРЗ	28.10.2006
15	забойка Курильского ЛРЗ	30.10.2006
16	р. Курилка, устье	31.10.2006
17	р. Осенняя	31.10.2006
18	р. Рейдовая, устье	01.11.2006
19	забойка Курильского ЛРЗ	07.11.2006
20	б.забойка Рейдового ЛРЗ	09.11.2006

Сопоставление дифференцирующей способности микросателлитных и аллозимных маркеров. Используемые нами маркеры позволяют различать стада географически далеких друг от друга регионов (Рубцова и др., 2007). Однако задача генетической идентификации стад близкорасположенных речных бассейнов не ставилась. Поэтому важнейшей целью данного исследования было определить, какие из генетических маркеров позволяют различить стада Рейдового и Курильского ЛРЗ.

Таблица 3 показывает, что средний уровень дифференциации стад Рейдового и Курильского ЛРЗ, выявляемый по микросателлитным локусам (0,41%), на порядок выше чем по аллозимным локусам (0,044%). При этом среди аллозимных маркеров лишь два локуса из 12-ти исследованных (*mMEP-2** и *ESTD**) сопоставимы по дифференцирующей способности со средним микросателлитным локусом.

Представленные данные указывают на недостаточную разрешающую способность аллозимных маркеров в целях идентификации столь близких стад кеты. Действительно, в пространстве «генетических координат» (главных компонент) три выборки из восьми из Рейдовского стада попали в один кластер с выборками из Курильского стада (рис. 3а). В то же время по микросателлитным маркерам кета Рейдового и Курильского стад образует неперекрывающиеся группировки (кластеры) в пространстве генетических координат (рис. 3б).

Таблица 3. Уровни дифференциации стад кеты бассейнов рек Рейдовой и Курилки по аллозимным и микросателлитным маркерам (показатель θ_F , в %).

Table 3. Levels of differentiation of chum salmon from Reidovaya and Kurilka river systems at allozyme and microsatellite markers (in terms of θ_F , %).

Аллозимы		Микросателлиты	
Локус	θ_F	Локус	θ_F
<i>ESTD*</i>	0,29	<i>Ogo2</i>	0,90
<i>LDH-A1*</i>	0,043	<i>Oke3</i>	0,17
<i>PEPB-1*</i>	0,13	<i>Oke11</i>	0,031
<i>PEPLT*</i>	0,074	<i>Oki1_1</i>	0,49
<i>sMDH-B1,2*</i>	0,0009	<i>Oki1_2</i>	0,34
<i>mMEP-2*</i>	0,47	<i>One103</i>	0,44
<i>GPDH-2*</i>	-0,12	<i>One109</i>	0,71
<i>PGDH*</i>	-0,14	<i>Ots3</i>	0,16
<i>ALAT*</i>	-0,16	<i>Ssa197</i>	0,29
<i>MPI*</i>	-0,20	<i>Ssa20.19</i>	0,54
<i>mIDHP-1*</i>	-0,13		
<i>sAAT-1,2*</i>	-0,27		
Суммарная оценка	0,044	Суммарная оценка	0,41
Доверительный интервал (95%)	[-0,10, 0,20]	Доверительный интервал (95%)	[0,24, 0,59]

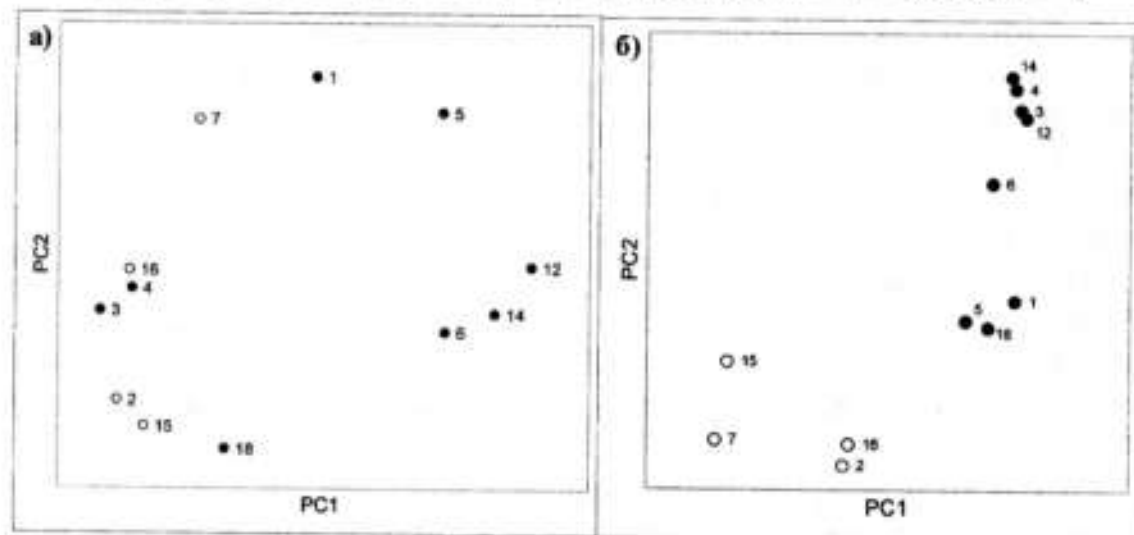


Рис. 3. Расположение 12-ти выборок кеты, взятых из Рейдовского (темные кружки) и Курильского (светлые кружки) стад в генетических координатах по аллозимным (а) и микросателлитным (б) маркерам.

Примечание: Генетические координаты (главные компоненты) PC1 и PC2 получены по матрице, составленной из величин генетических различий (F_{ST}), оцененных по частотам аллелей согласно методике для каждой пары выборок. Нумерация выборок – согласно обозначениям на рисунке 2; здесь указаны только те 12 выборок, которые были исследованы как по микросателлитным, так и по аллозимным маркерам.

Fig. 3. The position of twelve population samples of chum salmon from the Reidovaya river (black circles) and Kurilka river (white circles) in genetic coordinates based on allozyme (a) and microsatellite (b) markers.

Note: Genetic coordinates (principal components) PC1 and PC2 are based on the matrix composed of F_{ST} – values that have been estimated for each pair of populations. Here are the twelve samples that have been analyzed with both microsatellites and allozymes (see notation in fig.2).

Высокая дифференцирующая способность микросателлитов вероятно обусловлена их большим полиморфизмом: в 12-ти указанных на рисунке 3 выборках среднее число аллелей по микросателлитным и аллозимным маркерам составило, соответственно, 10,2 и 2,5. Отметим как важную деталь, что в пределах каждого стада разброс выборок на диаграмме (рис. 3) значителен, что отчасти вызвано некоторой гетерогенностью выборок (уровни значимости для каждого из стад 0,0023 и 0,0019, однако если не учитывать сильно отклоняющийся локус *oke3*, то уровни значимости равны 0,072 и 0,052), но в основном обусловлено большой выборочной погрешностью вследствие небольшого объема выборок (по 50 рыб в выборке). Конечно, для различения по микросателлитным маркерам кеты разных географических регионов (например, Сахалина и Курил) может оказаться достаточным и меньших объемов выборок, однако этого может быть недостаточно на внутри-региональном уровне. Более того, не исключена ситуация, когда популяции генетически различаются, но эти различия столь малы, что из-за выборочной погрешности оценки их генетических параметров перекрываются; в таких случаях 50 особей может оказаться недостаточно и в таком случае потребуется исследовать по 100 или даже больше рыб в каждой выборке.

Возврат от выпущенной молодежи. В целях изучения возврата от молодежи, выпущенной в 2004 г. с Курильского ЛРЗ, каждую выборку, в которой было более пяти рыб возраста 2+ (среди 50-ти рыб, проанализированных по микросателлитам), подразделили на подвыборку возраста 2+ и подвыборку из рыб остальных возрастных групп (3+ и старше). В целом в исследованных выборках наблюдалось преобладание рыб возраста 3+, затем возраста 4+; рыбы возраста 5+ редки; рыбы возраста 2+ встретились преимущественно на Курильском ЛРЗ вследствие большого возврата от заложенной на инкубацию икры в 2003 г. Рисунок 4 четко указывает на то, что рыбы 2+, зашедшие в р. Курилка, попадают в один генетический кластер с остальными выборками из бассейна Курилки; при этом группа возраста 2+ выборки №12 из бассейна р. Рейдовая легла в кластер Рейдового стада кеты. Эти факты указывают на то, что производители кеты Рейдового и Курильского стад, вернувшиеся в 2006 г. от ската 2004 г., остались генетически изолированными друг от друга.

Кстати, результаты этого раздела показывают, что создание популяционной референтной базы ДНК-данных и, вообще, популяционно-генетические исследования по кете и другим видам лососей с многовозрастным составом должны проводиться с обязательным параллельным биологическим анализом, учитывающим возраст, пол и другие признаки. Это еще раз поднимает рассмотренную выше проблему объема выборки, но уже в другом ракурсе. А именно, в нашем исследовании объемы выборок были, как правило, по 100 особей; из них по ДНК-маркерам генотипировали по 50 особей из выборки. Однако для лососей с большим числом возрастных классов объем выборки должен быть больше – с тем, чтобы основные возрастные группы были репрезентативно представлены в выборке.

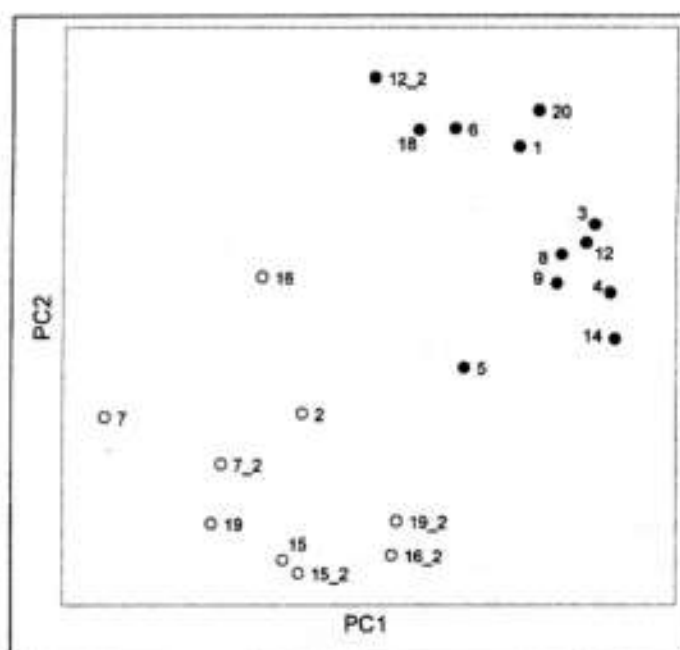


Рис. 4. Расположение выборок кеты с выделением возраста 2+, взятых из Рейдовского (темные кружки) и Курильского (светлые кружки) стад в генетических координатах по микросателлитным локусам.

Примечание: Возрастная структура выборки указана в ее обозначении: например, 7_2 означает рыб выборки №7 (см. кодировку выборок на рис.2) возраста 2+, в то время как 7 означает остальных рыб этой выборки. Возрастную группу 2+ выделяли, если только в данной выборке количество рыб возраста 2+, исследованных по микросателлитам, превышало пять.

Fig. 4. The position of samples of chum salmon from the Reidovaya river (black circles) and Kurilka river (white circles), with separating fishes of age 2+, in genetic coordinates based on microsatellite markers.

Note: Age structure of a sample is shown by specific notation. For example, 7_2 stands for sub-sample of fishes of age 2+ from sample #7, whereas here 7 means the rest of the sample (sample labels are those as in fig.2). Sub-sample of age 2+ was formed if its size excided five individuals.

Дифференциация других стад кеты о. Итуруп

Исследование единичных выборок кеты из трех других бассейнов Итурупа показало, что эти выборки лежат вне кластеров Рейдовского и Курильского стад кеты (рис. 5), указывая на то, что общее генетическое разнообразие кеты Итурупа не ограничивается генофондами Рейдовского и Курильского стад, а представлено также в генофондах других популяций Итурупа: эти три выборки значительно отличаются как друг от друга ($p < 0,001$), так и от Рейдовского и Курильского стад. Тем не менее, мы не можем по данным о единичных выборках сделать окончательный вывод о том, что другие стада Итурупа имеют свои собственные уникальные генофонды и свой собственный генетический «паспорт»: тот разброс выборок, который наблюдается как в Рейдовском, так и в Курильском стадах кеты (рис. 5), указывает на необходимость иметь различные по времени хода выборки из каждой популяции, чтобы выяснить перекрываются или нет их генофонды.

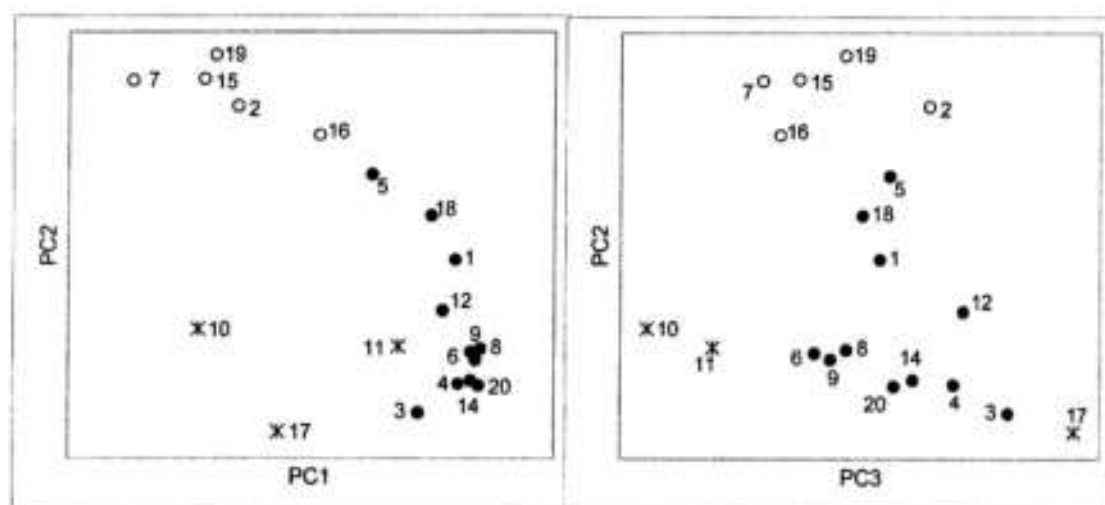


Рис. 5. Расположение выборок кеты из различных бассейнов о. Итуруп в генетических координатах по микросателлитным локусам.

Примечание: Ввиду большого числа различных популяций кеты анализировали три главных компоненты – PC1, PC2 и PC3. Обозначения выборок – соответственно на рисунке 2: р. Рейдовая (темные кружки), р. Курилка (светлые кружки), р. Рыбашская (10), руч. Порожистый (11), р. Осенняя (17).

Fig. 5. The position of samples of chum salmon from different rivers of Iturup Island in genetic coordinates based on microsatellite markers.

Note: Because of a large number of different chum populations, three principal components were calculated, PC1, PC2 and PC3. Labels of samples are as in fig.2: Reidovaya River (black circles), Kurilka River (open circles), Rybatskaya River (10), Porozhistiy Creek (11), and Osenjnaya River (17).

Тем не менее можно считать доказанным, что разнообразие в целом всей кеты Итурупа выше чем разнообразие, вносимое Рейдовским и Курильским стадами. Действительно, статистическая оценка уровня дифференциации по всем исследованным выборкам кеты из различных бассейнов Итурупа (а именно, 0,59% с доверительным интервалом [0,44, 0,71]) оказывается выше, чем оценка дифференциации Рейдовского и Курильского стад, указанная в таблице 3 (0,41%; формально значимость различий этих двух оценок недостоверна, поскольку их доверительные интервалы перекрываются, что означает необходимость большего охвата выборками других рек Итурупа – подобно тому, как это сделано для рек Рейдовая и Курилка). При этом выявляется очень важная деталь: наиболее дифференцирующими маркерами по всем исследованным популяциям становятся *Ssa20.19*, *Ssa197* и *Oke3*, бывшие не первыми в дифференциации Рейдового и Курильского стад. Следовательно, для конкретной пары стад может быть свой набор наиболее подходящих генетических маркеров, однако для решения проблем воспроизводства, идентификации и сертификации нескольких стад лососей, даже в пределах небольшого региона, следует развивать большой набор микросателлитных локусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стада кеты Рейдового и Курильского ЛРЗ четко различаются по микросателлитным маркерам, что свидетельствует об их популяционной

самостоятельности. В свою очередь, они значительно отличаются от кеты других исследованных бассейнов Итурупа. Это является основой для их идентификации в смешанных морских уловах и для сертификации деятельности по их воспроизводству и вылову. Дальнейшее уточнение должно идти по пути увеличения числа вовлекаемых в исследование локусов, поскольку имеются популяционно-специфичные наборы локусов.

Выявленная нами дифференциация географически близких популяций вероятно вызвана высоким хомингом кеты. Поэтому для нерки и чавычи также следует ожидать хорошего разрешения подобных межпопуляционных различий. Что касается горбуши, то ввиду большего стрэинга (Глубоковский, Животовский, 1986) у этого вида не ожидается столь заметной генетической дифференциации как у кеты, тем более что у горбуши имеется много микросателлитных нуль-аллелей, затрудняющих интерпретацию полученных генетических данных (A. Gharrett, личное сообщ.). Это диктует необходимость тщательной разработки методов анализа микросателлитных локусов горбуши, что даст возможность дифференцировать, по крайней мере, большие региональные стада этого вида.

Наше исследование позволяет сформулировать следующие принципы популяционно-генетических исследований тихоокеанских лососей при создании популяционных баз ДНК-данных, ориентированных на задачи воспроизводства, генетической идентификации и сертификации популяций лососей.

1) Каждая популяция должна характеризоваться рядом выборок, взятых с учетом пространственной и временной структуры стада: в течение нерестового хода (по крайней мере, выборки из начала, середины и конца хода), речные и озерные формы, сезонные формы, на забойках рыбоводных заводов и на нерестилищах и т.п.

2) Объем каждой выборки должен быть не менее 50-100 особей.

3) Генотипирование выборок должно быть обязательно совмещено с их биологическим анализом, по крайней мере, с определением пола и возраста.

4) Наиболее подходящими генетическими маркерами в целях дифференциации популяций являются микросателлиты. Именно на них следует в первую очередь направить работу по созданию референтных баз генетических данных по тихоокеанским лососям; при этом использование других типов генетического полиморфизма (моноклеотидных замен – SNP, рестрикционных фрагментов и нуклеотидных последовательностей митохондриальной ДНК и ядерных генов, фингерпринтов, аллозимов) может привнести важную дополнительную информацию.

5) В целях создания надежной базы генетических данных по стадам лососей следует наращивать число вовлекаемых генетических локусов, тем более что для каждой группы популяций дифференцирующим может оказаться свой специфический набор маркеров.

Настоящее исследование было поддержано грантами РАН «Динамика генофондов» и «Биоресурсы», и РФФИ 06-04-48136.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 286 с.
- Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Малинина Т.В., Салменкова Е.А., Омельченко Т.В., Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость и дифференциация популяций кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum), воспроизводимых сахалинскими рыболовными заводами. Генетика. 2006. Т. 42. №12. С. 1694-1702.
- Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Шитова М.В., Малинина Т.В., Животовский Л.А. Межрегиональная дифференциация кеты Сахалина и Южных Курил по микросателлитным локусам. Генетика. 2007 (в печати).
- Варнавская Н.В. Генетическая дифференциация популяций тихоокеанских лососей. КамчатНИРО, 2006. 488 с.
- Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Информационный Вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. №1. С. 74-96.
- Глубоковский М.К., Животовский Л.А. Популяционная структура горбуши: система флюктуирующих стад // Биология моря. 1986. №2. С. 39-44.
- Рубцова Г.И., Афанасьев К.И., Малинина Т.В. и др. Дифференциация популяций кеты по микросателлитным и аллозимным маркерам // Генетика. 2007 (в печати).
- Салменкова Е.А., Алтухов Ю.П., Викторский Р.М. и др. Генетическая структура популяций кеты, размножающейся в реках Дальнего Востока и Северо-Востока СССР // Журнал общей биологии. 1986. Т. 46. №4. С. 529-549.
- Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Афанасьев К.И., Рубцова Г.А. Генетическое разнообразие азиатской кеты *Oncorhynchus keta* Walbaum (Salminidae, Salmoniformes) и динамика генофондов популяций при искусственном воспроизводстве // Вопросы ихтиологии. 2007 (в печати).
- Bucholz W.G., Miller S.J., Spearman W.J. Isolation and characterization of chum salmon microsatellite loci and use across species // Animal Genetics. 2001. V. 32. Pp. 162-165.
- Chen J.-P., Sun D.-J., Dong Ch.-Zh. et al. Genetic analysis of four wild chum salmon *Oncorhynchus keta* populations in China based on microsatellite markers // Environmental Biology of Fishes. 2005. V. 73. Pp. 181-188.
- Lewis P.O., Zaykin D. Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. 2001. (<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>)
- Scribner K.T., Crane P.A., Spearman W.J., Seeb L.W. DNA and allozyme markers provide concordant estimates of population differentiation: analyses of Yukon River fall-run chum salmon (*Oncorhynchus keta*) // Can.J.Fish.Aquat.Sci. 1998. V. 55. Pp. 1748-1758.
- Seeb L.W., Crane P.A., Kondzela Ch.M., Wilmot R.L., Urawa Sh., Varnavskaya N.V., Seeb J.E. Migration of Pacific Rim chum salmon of the high seas: insights from genetic data // Environmental Biology of Fishes. 2004. V. 69. Pp. 21-36.
- Small M.P., Frye A.E., Von Bargen J.F., Young S.F. Genetic structure of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) populations in the lower Columbia River: are chum salmon in Cascade tributaries remnant populations? // Conservation Genetics. 2006. V. 7. Pp. 65-78.

Springer M. SNPs – a great catch for salmon genotyping // American Laboratory. 2006. V. 38. №10. Pp. 34-38.

SPSS for Windows. Release 11.5.0. Standard version. 2002 // SPSS Inc.

Weir B.S. Genetic Data Analysis II. Methods for Discrete Population Genetic Data // Sinauer Ass., Sunderland, Mass. 1996. 445 p.

**ON DEVELOPMENT OF A DNA DATABASE FOR
REPRODUCTION, IDENTIFICATION AND CERTIFICATION
OF POPULATIONS OF PACIFIC SALMON: AN EXAMPLE
FROM CHUM SALMON OF ITURUP ISLAND**

© 2008 y. L.A. Zhivotovsky¹, K.I. Afanasiev¹, G.A. Rubtsova¹, M.V. Shitova¹,
T.V. Malinina¹, T.A. Rakitskaya¹, V.D. Prokhorovskaya¹, E.A. Salmenkova¹,
L.K. Fedorova², S.I. Borzov³, V.P. Pogodin⁴

1 – Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

2 – Fish-breeding Division, ZAO «Gidrostroy», Yuzhno-Sakhalinsk, Sakhalin

3 – Scientific-research station «Reidovo», FGU «Sakhalinrybvod», Iturup

4 – Hatchery «Kurilskiy», Iturup

Sustainable reproduction, stock identification, and ecological certification of fishery need knowledge of inherited features of populations. This requires a database that includes genetic data on stocks involved. One of the leading aims of such a database is a possibility to genetically distinguish populations. Then the following principal questions arise: What genetic markers should be used; Do these markers allow to distinguish geographically closed stocks and their components; How to sample for the purposes of such a database? As an example, we studied two stocks of chum salmon (*Oncorhynchus keta*), one from the Kurilka River and the other from the Reidovaya River system, the Iturup Island, during the period of spawning run. It was shown that the stocks are well distinguished from each other using microsatellite markers. In turn, these stocks differ from other chum salmon populations of Iturup Island. The results of the study suggest the following requirements for DNA databases on Pacific salmon to establish genetic differentiation:

- microsatellites are suitable markers for distinguishing populations;
- in a given river basin, biological samples ought to be taken from natural spawning locations, and from enhanced components of the stock as well (hatcheries, etc.), following the spatial and temporal structure of the stock;
- at each location of collecting biological material, more than one population sample ought to be taken (at least, in the beginning, in the middle, and in the end of the spawning run);
- the size of each sample should be not less than 50-100 fish;
- additionally to genotyping, determining the age, sex and other biological characters of fish sampled is important for detailed population-genetic analysis.