

АКВАКУЛЬТУРА И ИСКУССТВЕННОЕ ВОСПРОИЗВОДСТВО

УДК 575.174.015.3

МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЗАВОДСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ КЕТЫ
(*ONCORHYNCHUS KETA* WALBAUM) О. САХАЛИН

© 2009 г. М.В. Шитова¹, К.И. Афанасьев¹, Г.А. Рубцова¹, Т.В. Малинина¹,
С.В. Сидорова², Л.А. Животовский¹

1 – Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва 119991

2 – ФГУ «Сахалинрыбвод», Южно-Сахалинск 693006

Поступила в редакцию 27.05.2008 г.

Окончательный вариант получен 08.08.2008 г.

Выборки кеты рыбоводных заводов Сахалина генетически достоверно различаются между собой по десяти микросателлитным маркерам ($p < 0,001$). Популяции юго-западного Сахалина (Калининский, Сокольниковский и Ясноморский ЛРЗ) наименее гетерогенны: характеризуются наименьшим числом аллелей и наименьшей средней гетерозиготностью. Генетическая дифференциация исследованных популяций хорошо согласуется с их географическим расположением: в пространстве главных компонент по частотам аллелей заводские популяции формируют обособленные группы, соответствующие четырем районам Сахалина (юго-западный, южный и юго-восточный, восточный, северо-восточный). Такая картина указывает на генетическое своеобразие кеты каждого из выделенных районов, сохраняющееся несмотря на перевозки икры между ними.

ВВЕДЕНИЕ

Кета принадлежит к видам тихоокеанских лососевых, имеющих важное промысловое значение: она занимает второе место в уловах лососевых после горбуши. В последние годы наметилась тенденция по увеличению заводского воспроизводства этого вида. Многие лососевые рыбоводные заводы (ЛРЗ) Российского Дальнего Востока, в 1970-1980 гг. преимущественно разводившие горбушу, сейчас прилагают усилия по восстановлению численности кеты, а в некоторых случаях – по формированию новых стад. Кета – основной объект разведения на японских рыбоводных заводах, а выпуск молоди кеты на ЛРЗ Российского Дальнего Востока, в том числе Сахалина, превышает 50% (Смирнов и др., 2006).

В этой связи идет изучение популяционно-генетической структуры кеты, что весьма важно для организации промысла и искусственного воспроизводства тихоокеанских лососей. Генетический мониторинг позволяет оценить состояние популяций кеты и своевременно предпринять меры по устранению негативных факторов (недостаточный или чрезмерный пропуск производителей на нерестилища, частичное, а не полное воспроизведение генофонда популяции реки и т.д.) (Алтухов и др., 1997; Животовский, 2006б). Знание генетических характеристик стад позволяет оценить коэффициенты возврата рыбы в реку-«реципиент» после транспортировки икры.

Популяционно-генетическая структура кеты достаточно полно изучена по полиморфным белковым маркерам практически по всему ее ареалу. Показана дифференциация популяций кеты из различных частей ареала (Алтухов и др., 1980, 1997; Ефремов, Иванкова, 2002; Бачевская и др., 2001; Салменкова и др., 1986, 1992, 1994; Макоедов, 1999; Варнавская, 2006; Okazaki, 1982; Beachem et al., 1985; Winans et al., 1990;

Seeb, Crane, 1999; Seeb et al., 2004; Wilmot et al., 1998). На основании полученных данных выработаны рекомендации по оптимизации искусственного разведения и организации рационального промысла кеты, предприняты попытки определить вклад различных стад в смешанных скоплениях, облавливаемых морским промыслом, и оценить эффективность акклиматизационных мероприятий.

Однако белковые маркеры не всегда позволяют выявить различия между популяциями кеты. Причина – небольшой полиморфизм белковых маркеров (Животовский и др., 2008; Рубцова и др., 2008). Более перспективны в этом плане высокополиморфные маркеры ДНК. В частности, известны исследования полиморфизма митохондриальной (мт) ДНК (Брыков и др., 2000, 2003; Полякова и др., 2006); рассчитано предположительное время независимой дивергенции между популяциями, показано влияние рыбоводного процесса на разнообразие популяции кеты. Еще большей разрешающей способностью обладают микросателлиты.

Микросателлиты или короткие tandemные повторы последовательностей (STR – Short Tandem Repeats, или SSR – Simple Sequence Repeats) представляют собой фрагменты ДНК с большим количеством – до сотни и даже выше – tandemно повторяющихся идентичных «мотивов» или «повторов»: коротких последовательностей из нескольких (от одной до шести) пар нуклеотидов. Микросателлиты обладают рядом характеристик, делающих их весьма удобными для изучения генетической дифференциации популяций и межпопуляционных взаимосвязей (Животовский, 2006а; Животовский и др., 2008):

1. Для типирования микросателлитов требуется небольшое количество ДНК, которое можно экстрагировать из любой доступной ткани организма, даже из сильно разложившегося биологического материала.
2. Высокие темпы мутирования в микросателлитных локусах приводят к накоплению популяционно-специфических мутаций, являющихся причиной высокого полиморфизма по этим локусам.
3. Микросателлиты в целом более нейтральны, чем белковые маркеры, поскольку в популяционные исследования вовлекаются локусы, локализованные в интронах и других некодирующих участках генома.

На основе анализа микросателлитных маркеров определены характеристики популяций кеты отдельных рек Северной Америки, Китая и Японии (Yoon et al., 2005; Scribner et al., 1998; Jin-Ping Chen et al., 2005; Small et al., 2006; Yoon et al., 2006). Начато детальное изучение популяций Российского Дальнего Востока (Афанасьев и др., 2006, 2008; Рубцова и др., 2008; Животовский и др., 2008).

Цель настоящей работы – оценить генетическое разнообразие заводских популяций кеты о. Сахалин на основании анализа полиморфизма микросателлитных локусов и получить характеристики популяций для последующего генетического мониторинга в целях решения генетических проблем идентификации и сертификации при искусственном воспроизводстве стад кеты.

Для достижения намеченной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить генетическую изменчивость заводских популяций кеты Сахалинской области по 10-ти апробированным микросателлитным локусам.

2. Создать основу для формирования базы данных генетических характеристик заводских популяций кеты.

3. Исследовать особенности дифференциации популяций кеты с учетом данных по межзаводским перевозкам икры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было проанализировано шестнадцать выборок производителей кеты, взятых в 2003-2005 гг. на десяти рыболовных заводах о. Сахалин (табл. 1): Адо-Тымовский ЛРЗ – 2003, 2004 гг., Буюкловский ЛРЗ – 2005 г., Побединский ЛРЗ – 2005 г., Калининский ЛРЗ – 2003, 2004 гг., Сокольниковский ЛРЗ – 2004 г., Ясноморский ЛРЗ – 2005 г., Охотский ЛРЗ – 2003, 2004, 2005 гг., Таранайский ЛРЗ – 2003, 2004 гг., Соколовский ЛРЗ – 2003, 2004 гг., ЛРЗ «Монетка» – 2005 г. (рис. 1). Размер каждой выборки составил 50 экземпляров.

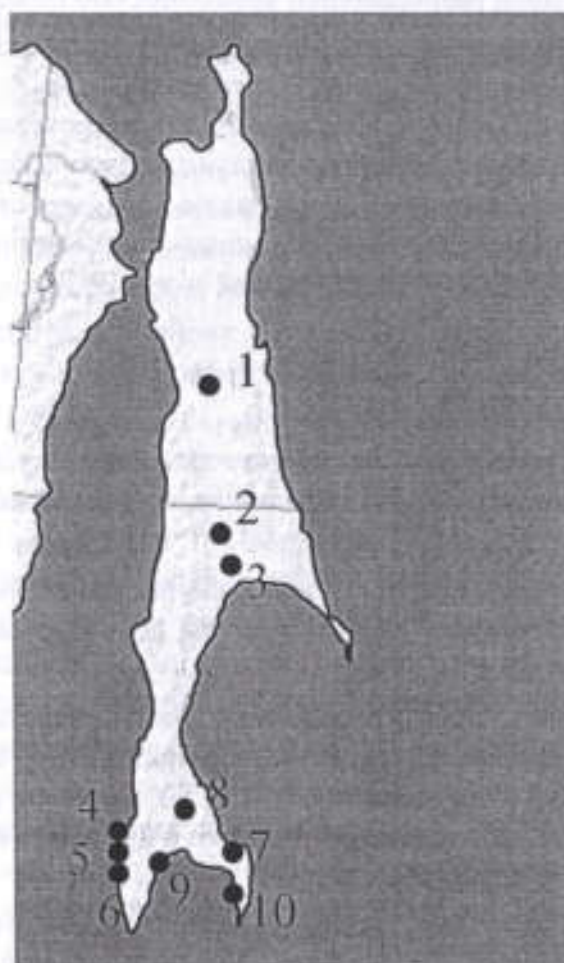


Рис. 1. Карта выборок кеты: 1 – Адо-Тымовский ЛРЗ, 2 – Побединский ЛРЗ, 3 – Буюкловский ЛРЗ, 4 – Калининский ЛРЗ, 5 – Сокольниковский ЛРЗ, 6 – Ясноморский ЛРЗ, 7 – Охотский ЛРЗ, 8 – Соколовский ЛРЗ, 9 – Таранайский ЛРЗ, 10 – ЛРЗ «Монетка».

Fig. 1. Map of samples: 1 – Ado-Tymovo hatchery, 2 – Pobedino hatchery, 3 – Bujukly hatchery, 4 – Kalinino hatchery, 5 – Sokolniki hatchery, 6 – Yasnomorka hatchery, 7 – Okhotsk hatchery, 8 – Sokol hatchery, 9 – Taranai hatchery, 10 – Monetka hatchery.

Для анализа ДНК образцы ткани (печень, плавник) фиксировали в 96% этаноле. Тотальную ДНК выделяли по стандартной методике с помощью набора реактивов «Diatom DNA Prep» фирмы ООО «ИзоГен» и методом фенол-хлороформной депротеинизации и экстракции. ДНК разводили до концентрации 50-100 нг/мкл деионизированной водой, буфером TE (Маниатис и др., 1984) или «ЭкстраГеном» (ООО «ИзоГен», Россия).

Для ПЦР-амплификации использовали наборы Gene Park PCR Core (ООО «ИзоГен», Россия), к которым добавляли 5 мкл смеси праймеров (конечная концентрация каждого – 0,5 мкМ) и 5 мкл исследуемой ДНК. Амплификацию микросателлитных локусов проводили в термоциклере «MJ Research PTC-100» при следующем режиме: 8 циклов, включающих 1 мин денатурации ДНК-матрицы при 94 °C, 30 с отжига праймеров при X °C и синтез новых цепей – 30 с при 72 °C; затем следовал 21 цикл, включающий 30 с при 94 °C, 30 с – X °C и 15 с при 72 °C; элонгация 3 мин при 72 °C. X – температура отжига для индивидуальной пары праймеров (Афанасьев и др., 2006).

В основном локусы характеризуются ди- и тетра- повторяющимися последовательностями. Только локус *Oke3* – минисателит, характеризуется тринадцатичленными повторами. В этом же локусе нами был обнаружен нуль-аллель (неопубликованные данные). При использовании праймеров *Okil* амплифицируются два локуса, значительно отличающиеся по размеру и демонстрирующие независимую изменчивость. Возможно, это результат дупликации с последующей дивергенцией двух локусов. В анализе учитывались оба локуса, обозначенные нами как *Okil-1* (180-276 b.p.) и *Okil-2* (90-102 b.p.).

Таблица 1. Сроки взятия выборок.

Table 1. Dates of sampling.

Район	Лососевые рыбозаводные заводы	Сроки взятия выборок
Северный Сахалин	Адо-Тымовский	04.09.03
		17.09.04
Восточный Сахалин	Буюкловский	24.09.05
	Побединский	24.09.05
Юго-западный Сахалин	Калининский	30.08.03
	Сокольниковский	08.09.04
		14.09.04
	Ясноморский	28-30.09.05
Южный и юго- восточный Сахалин	Охотский	15.09.03
		24.09.04
		05.10.05
	Таранайский	16.09.03
		23.09.04
	Соколовский	11.09.03
		13.09.04
	«Монетка»	29.09.05

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6% или 8% неденатурирующем полиакриламидном геле в 1хТБЕ буфере (Маниатис и др., 1984) при 300 В в течение 2-3 часов, окрашивали бромистым этидием (5 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете. В качестве маркеров длины фрагментов использовали стандарты молекулярной

массы в 25 bp, 100 bp, («Promega») и ДНК плазмиды pBr322, обработанную рестриктазами HaeIII или HpaII. Размеры аллелей по каждому локусу определяли с использованием программы «1D Image Analysis Software Version 3.5» фирмы Kodak. Число обнаруженных аллелей составляло от 4 (*Oki1-2*) до 28 (*One103*) (табл. 2).

Таблица 2 Число обнаруженных аллелей в исследованных микросателлитных локусах.
Table 2. Number of alleles discovered at the microsatellite loci studied.

Локус	Число аллелей/число исследованных рыб
<i>Ssa197</i>	6/801
<i>Ssa20.19</i>	6/799
<i>Ogo2</i>	9/791
<i>Oki1-1</i>	23/794
<i>Oki1-2</i>	4/801
<i>Oke3</i>	11/796
<i>Oke11</i>	7/800
<i>One103</i>	28/797
<i>One109</i>	17/795
<i>Ots3</i>	16/796

Оценку частот аллелей и гетерозиготности, среднее число аллелей на локус, коэффициенты попарного сходства популяций (coancestry identity), а также статистические тесты на соответствие наблюдаемых по каждому локусу генотипических распределений равновесию Харди-Вайнберга (индекс фиксации f), тесты на неравновесие по сцеплению и степень дифференциации популяций (θ , аналог F_{st} (Вейр, 1995)) осуществляли с использованием программы GDA (Lewis, Zaykin, 2001).

Для определения значимости межпопуляционных различий по точному критерию Фишера использовали метод пермутаций (Guo, Thompson, 1992; Zaykin et al., 1995). Уровень значимости для множественных тестов определялся с учетом поправки Бонферрони (Вейр, 1995). Для вычисления общего уровня значимости по нескольким тестам использовали комбинированный тест Фишера (Животовский, 1991). На основе матрицы коэффициентов попарного сходства, определяли координаты каждой выборки в пространстве главных компонент изменчивости по программе Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 3 представлены данные, характеризующие микросателлитную изменчивость популяций кеты. Отметим высокий полиморфизм кеты по исследованным локусам: в целом по всем выборкам среднее число аллелей на локус превышает 8.

По результатам анализа микросателлитной изменчивости наименьшим разнообразием (средним числом аллелей и средней гетерозиготностью) характеризуются популяции юго-западного Сахалина.

Такая картина, отмечена впервые для данного района. В работе Yoon et al. (2006), напротив, показано наибольшее генетическое разнообразие кеты р. Калининка по пяти микросателлитным локусам среди выборок России, к сожалению, в данной работе изучалась только одна река данного района Сахалина. По биохимическим и митохондриальным маркерам эта группа популяций не характеризуется низкими показателями разнообразия (Салменкова и др., 1986, 1992, 2008; Sato et al., 2004; Yoon et al., 2004). По биохимическим маркерам разнообразие этой группы популяций сравнимо с показателями разнообразия других

популяций Сахалина (Салменкова и др., 1986, 1992, 2008). По митохондриальной ДНК в популяциях юго-западного Сахалина разнообразие выше большинства изученных популяций России (Sato et al., 2004; Yoon et al., 2004).

Обнаруженное нами низкое разнообразие подтверждает мнение ряда исследователей о действии «эффекта основателя» в период формирования базового стада – Калининского ЛРЗ (Салменкова и др., 1986, 1992; Алтухов и др., 1980, 1997), но не исключает и естественного генетического своеобразия кеты юго-западного Сахалина.

В пяти выборках отмечено достоверное отклонение от равновесия Харди-Вайнберга по суммарному критерию Фишера (табл. 3). В выборке 2004 г. Охотского ЛРЗ отклонение наблюдается только по локусу *Oke3*, но, как отмечено ранее, в этом локусе обнаружен нуль-аллель. Если считать отклонение от равновесия Харди-Вайнберга с учетом нуль-аллеля, то по суммарному критерию Фишера отклонение перестает быть значимым.

Таблица 3. Изменчивость популяций по исследованным микросателлитным локусам.

Table 3. Within-population variability at the microsatellite loci.

Район	Лососевые рыбозаводные заводы	год	Показатели				
			<i>A</i>	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>	<i>f</i>	<i>p</i>
Северный Сахалин	Адо-Тымовский	2003	8,9	0,6467	0,6414	0,0084	0,5581
		2004	8,8	0,6565	0,6260	0,0469	0,0586
Восточный Сахалин	Бузукловский	2005	8,9	0,6802	0,6274	0,0784	0,0030*
	Побединский	2005	8,7	0,6734	0,6640	0,0141	0,7478
Юго-западный Сахалин	Калининский	2003	5,9	0,5648	0,5540	0,0194	0,2130
		2004	5,7	0,5528	0,5480	0,0091	0,2300
	Сокольниковский	2004	7,2	0,5670	0,5540	0,0232	0,1905
	Ясноморский	2005	7,7	0,5986	0,5729	0,0432	0,0018*
Южный и юго-восточный Сахалин	«Монетка»	2005	8,0	0,5922	0,6223	-0,0515	0,8769
	Охотский	2003	8,6	0,6393	0,6227	0,0261	0,2412
		2004	8,8	0,6565	0,6280	0,0438	0,0364*
		2005	8,8	0,6465	0,6460	0,0008	0,0559
	Соколовский	2003	8,3	0,6337	0,6360	-0,0037	0,0149*
		2004	8,8	0,6348	0,6216	0,0211	0,7833
	Таранайский	2003	8,4	0,6355	0,5900	0,0722	0,0150*
		2004	8,5	0,6514	0,6360	0,0238	0,5709

Примечание: *A* – среднее число аллелей на локус; *H_e* – средняя ожидаемая гетерозиготность; *H_o* – средняя наблюдаемая гетерозиготность; *f* – индекс фиксации (Вейр, 1995); *p* – уровень значимости тестов на соответствие наблюдаемых генотипических распределений популяций равновесию Харди-Вайнберга (по 10-ти локусам); * – достоверное отклонение от равновесия Харди-Вайнберга.

Note: *A* – average number of alleles per locus; *H_e* – average expected heterozygosity; *H_o* – average observed heterozygosity; *f* – fixation index (Weir, 1995); *p* – significance level for the Hardy-Weinberg expectation (at 10 loci); * – significant deviation from the Hardy-Weinberg proportions.

Выборка 2003 г. Таранайского ЛРЗ характеризует производителей смешанной закладки 1998 г. (Афанасьев и др., 2006). Остальные выборки, вероятнее всего, также являются смешанными. С учетом поправки Бонферрони в выборках Охотского ЛРЗ 2004г., Соколовского ЛРЗ 2003 г. и Таранайского ЛРЗ 2003 г. отклонения от равновесия Харди-Вайнберга перестают быть значимыми.

Распределение выборок в пространстве главных компонент показывает, что генетическая дифференциация популяций хорошо согласуется с их географическим положением (рис. 2).

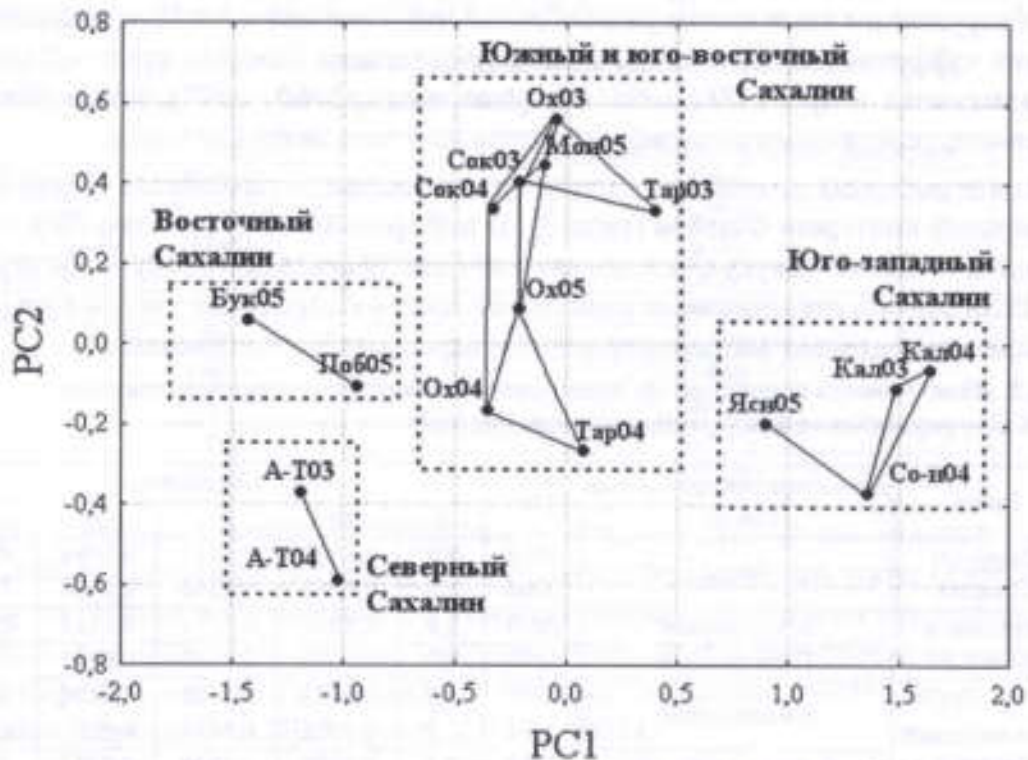


Рис. 2. Расположение выборок кеты в пространстве главных компонент: А-Т03 и А-Т04 – Адо-Тымовский ЛРЗ 2003 и 2004 гг. соответственно, Бук05 – Буюкловский ЛРЗ 2005 г., Кал03 и Кал04 – Калининский ЛРЗ 2003 и 2004 гг. соответственно, Мон05 – ЛРЗ «Монетка» 2005г., Ох03, Ох04 и Ох05 – Охотский ЛРЗ 2003, 2004 и 2005 гг. соответственно, Поб05 – Побединский ЛРЗ 2005 г., Сок03 и Сок04 – Соколовский ЛРЗ 2003 и 2004 гг. соответственно, Со-п04 – Сокольниковский ЛРЗ 2004 г., Тар03 и Тар04 – Таранайский ЛРЗ 2003 и 2004 гг. соответственно, Яси05 – Ясноморский ЛРЗ 2005 г. **Примечание:** пунктиром обведены группы популяций соответствующего района, сплошной линией соединены популяции, между которыми нет достоверных различий по частотам аллелей исследованных локусов.

Fig. 2. Location of samples in the plot of principal components: А-Т03 and А-Т04 – Ado-Tymovo hatchery, 2003 and 2004, respectively; Бук05 – Bujukly hatchery, 2005 г.; Кал03 и Кал04 – Kalinino hatchery, 2003 and 2004; Мон05 – Pobedino hatchery, 2005; Ох03, Ох04, and Ох05 – Okhotsk hatchery, 2003, 2004 and 2005; Поб05 – Pobedino hatchery, 2005; Сок03 и Сок04 – Sokol hatchery, 2003 and 2004; Со-п04 – Sokolniki hatchery, 2004; Тар03 и Тар04 – Taranai hatchery, 2003 and 2004; Яси05 – Yasnomorka hatchery, 2005.

Note: dashed are populations from the same geographic region of Sakhalin; solid lines connect populations that do not differ significantly from each other in allele frequencies.

Оценка генетической гетерогенности с помощью псевдо-вероятностного теста, с высокой степенью достоверности ($p < 0,001$), выявила значительные межпопуляционные различия. При попарном сравнении выборок, достоверные различия по частотам аллелей отсутствовали между выборками с одного завода, но разных лет сбора (Адо-Тымовский, Соколовский и Калининский ЛРЗ, а также выборки Охотского ЛРЗ 2004 и 2005 гг.). Исключение составил Таранайский ЛРЗ. Также не было различий между выборками с разных ЛРЗ, но из одного района (Буюкловский и Побединский (оба ЛРЗ располагаются в бассейне

р. Поронай); Сокольниковский и Калининский; Сокольниковский и Ясноморский ЛРЗ; Таранайский и Охотский; Таранайский и Соколовский; Охотский и Соколовский; «Монетка» и Охотский; «Монетка» и Соколовский ЛРЗ) (рис. 2).

Выборки Таранайского ЛРЗ 2003 и 2004 гг. различаются, вероятно, из-за выборки 2003 г., являющейся возвратом от смешанной закладки 1998 г. (Афанасьев и др., 2006).

Сходство же выборок, взятых из разных заводов внутри выделенных групп, скорее всего, объясняется как географической близостью (возможен более высокий стрэинг по сравнению с отдаленными районами), так и многочисленными перевозками икры в конкретном районе (рис. 3).

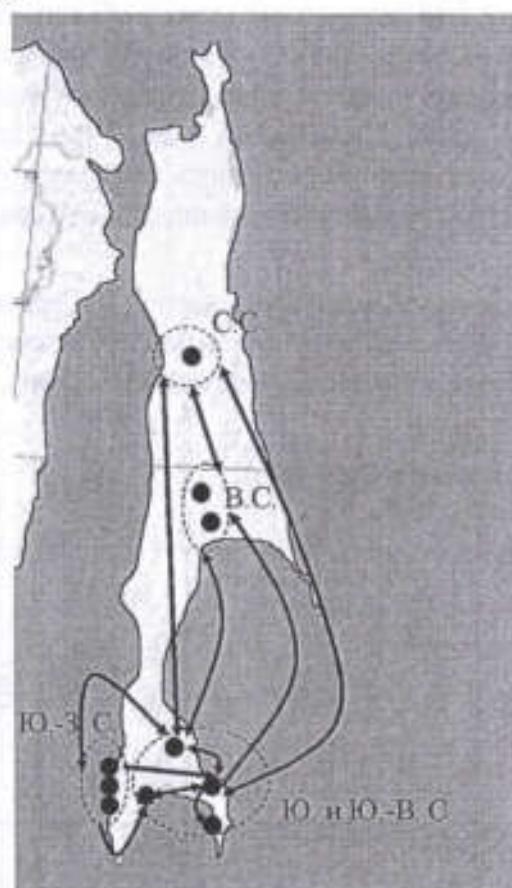


Рис. 3. Схема перевозок оплодотворенной икры кеты между ЛРЗ Сахалина за период 1960-2000 гг. С. С. – северный Сахалин, В. С. – восточный Сахалин, Ю.-З. С. – юго-западный Сахалин, Ю. и Ю.-В. С. – южный и юго-восточный Сахалин. Расположение заводов такое же как и на рис. 1.

Fig. 3. The scheme of transplantation between the Sakhalin hatcheries in the years from 1960 to 2000. С. С. – northern Sakhalin, В. С. – eastern Sakhalin, Ю.-З. С. – southwestern Sakhalin, Ю. и Ю.-В. С. – southern and southeastern Sakhalin. Location of hatcheries is shown in fig. 1.

Выборки внутри выделенных групп (южный и юго-восточный, северный, восточный, юго-западный Сахалин) обособлены от остальных выборок и достоверно отличаются от них по частотам аллелей исследованных локусов, что свидетельствует о генетическом своеобразии каждого района. Южный и юго-восточный Сахалин имеет определенную гетерогенность, но она значительно сглажена, вероятно, из-за неоднократных внутригрупповых перевозок икры.

За всю историю существования заводов было произведено большое количество транспортировок икры как внутри выделенных групп заводов, так и межгрупповых. С 1964 по 1971 гг. ежегодно икру перевозили с Калининского ЛРЗ в р. Найбу (в бассейне реки располагается Соколовский и Березняковский ЛРЗ). Всего было перевезено около 387 млн. шт. икры. Также осуществляли перевозки из популяций южного и юго-восточного Сахалина на северный, восточный и юго-западный Сахалин; с северного на восточный Сахалин. Проводили и обратные перевозки (рис. 3, табл. 5) (данные Сахалинрыбвода; Алтухов и др., 1980).

Можно заметить, что генетическая дифференциация заводских популяций кеты разных районов Сахалина сохраняется, что скорее всего можно объяснить меньшей интенсивностью перевозок между ЛРЗ разных районов (табл. 5). Ранее, по данным об аллозимных маркерах, было высказано предположение о малой эффективности многих перевозок, особенно межрайонных (Алтухов и др., 1980; Салменкова и др., 1986); однако такая интерпретация неоднозначна, поскольку аллозимная изменчивость контролируется отбором, который мог изменить генетическую структуру трансплантированной части стада и сделать ее неотличимой от нативной структуры.

Величина межпопуляционной дифференциации, измеряемая показателем θ_{ST} (аналог F_{ST} (Вейр, 1995)), показывает долю межпопуляционной изменчивости в общей изменчивости. В среднем по всем локусам она принимает значения 2,85%, (табл. 4), выступая статистически значимой величиной.

Таблица 4. Дифференциация популяций (θ_{ST} в %).

Table 4. Population differentiation (θ_{ST} in %).

	<i>Ssa197</i>	<i>Ssa20,19</i>	<i>Ogo2</i>	<i>Oke3</i>	<i>Oke11</i>	<i>Ok11-1</i>	<i>Ok11-2</i>	<i>One103</i>	<i>One109</i>	<i>Oks3</i>	Среднее	95%-ный бутстреп интервал	
												нижний	верхний
Между выделенными группами популяций	0,78	9,43	4,12	4,36	3,31	1,05	2,17	1,07	2,61	2,15	2,85	1,79	4,29

У кеты Приморского региона по биохимическим маркерам значение F_{ST} составило 1,9% (Ефремов, Иванкова, 2002). По данным Салменковой с соавторами (1986), значение G_{ST} по биохимическим маркерам в сахалино-амурской группе популяций – 1,86%, а в северо-восточной группе (североохотоморские, восточнокамчатские и из бассейна р. Анадырь) значение G_{ST} – 1,74%.

Из приведенных данных видно, что микросателлитные локусы даже в пределах одного региона (о. Сахалин) показывают более высокий уровень межпопуляционной дифференциации по сравнению с биохимическими маркерами.

Таблица 5. Интенсивность перевозок икры (в % от общей закладки икры ЛРЗ-«реципиента») в 1990-2000 гг.
Table 5. Rates of transplantation (% of the total amount of eggs in the recipient-hatchery).

гг.	Восточный Салал		Юго-западный Салал		Южный и юго-восточный Салал		Северный Салал	
	На Побединский	На Буковинский	На Калининский	На Сельтинский	На Сельтинский	На Березинский	На Тиринский	На Ала-Тувинский
1990	Буковинский 36,8	-	-	-	-	Охотский 100	-	-
1991	Буковинский 64,5	-	-	-	-	-	-	-
1994	-	-	-	-	Буковинский 32,0 Березинский 5,5 Охотский 45,3	-	-	-
1995	-	-	-	-	Березинский 3,7 Охотский 96,3	-	-	-
1996	-	-	-	-	Побединский 5,8 Охотский 61,5	-	-	Буковинский 4,3 Охотский 6,0
1997	-	-	-	Калининский 4,0 Ясногорский 6,9	Охотский 86,0 Охотский 100	-	-	Побединский 17,7 Буковинский 12,3 Охотский 10,7
1998	-	Охотский 17,3	Ясногорский 2,2	-	Охотский 90,0 Охотский 100	Охотский 51,0 Сельтинский 37,2	-	-
1999	-	Побединский 23,0 Охотский 5,9	-	-	Охотский 43,0 Залом 43,6	Охотский 100	-	-
2000	-	-	-	-	Буковинский 84,0 Березинский 16,0	Буковинский 93,0 Ясногорский 63,5	-	-

Из таблицы видно, что наибольший вклад в дифференциацию популяций кеты Сахалина вносят локусы *Ssa20*, *19*, *Ogo2*, *Oke3*, *Oke11*, *One109*. Минимальный – *Ssa197*. Вклад локусов в дифференциацию стад кеты различных регионов зависит от представленности в выборках тех или иных нерестовых группировок, различных лет сбора и др. (Афанасьев и др., 2008; Животовский и др., 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование десяти микросателлитных локусов в 24-х выборках кеты ЛРЗ Сахалина показало высокий уровень ее изменчивости по исследованным локусам. Наименьшим разнообразием характеризуются популяции юго-западного Сахалина.

Искусственно воспроизводимые популяции сахалинских рек имеют хорошо выраженную дифференциацию, согласующуюся с географическим расположением заводов. Кета выделенных районов (северный, восточный, южный и юго-восточный, юго-западный Сахалин) обособлена от кеты соседствующих районов и достоверно отличаются друг от друга по частотам аллелей исследованных локусов. Такая картина указывает на генетическое своеобразие каждой группы популяций и относительную репродуктивную изоляцию этих групп друг от друга. Интересно отметить, что в отличие от значимой дифференциации между районами Сахалина, различия между популяциями кеты в пределах района незначительны, что может быть связано с большей интенсивностью перевозок между ЛРЗ внутри районов по сравнению с перевозками между районами, а также возможным булшем стрингом между географически близкими нерестовыми группировками кеты.

Представленные данные могут быть использованы как начальная точка отсчета для последующего генетического мониторинга заводских популяций кеты по данному классу ДНК-маркеров – микросателлитам.

Настоящее исследование поддержано грантами Программ фундаментальных исследований Президиума РАН: «Молекулярная и клеточная биология», «Биоразнообразие и динамика генофондов» («Подпрограмма «Динамика генофондов»), а также грантом РФФИ №08-04-00445-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с.
- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Рябова Г.Д., Куликова Н.И. Генетическая дифференциация популяций кеты и эффективность некоторых акклиматизационных мероприятий // Биология моря. 1980. №3. С. 23-38.
- Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Малинина Т.В. и др. Микросателлитная изменчивость и дифференциация популяций кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum), воспроизводимых сахалинскими рыбодобными заводами // Генетика. 2006. Т. 42. №12. С. 1694-1702.
- Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Шитова М.В. и др. Межрегиональная дифференциация кеты Сахалина и Южных Курил по микросателлитным локусам // Генетика. 2008. (№7, в печати).
- Бачевская Л.Т., Велижанин Е.С., Пустовойт С.П., Хованский И.Е. Генетическая изменчивость популяций кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) рек северного побережья охотского моря в условиях искусственного воспроизводства // Вопросы рыболовства. 2001. Т. 2. №1(5). С. 125-139.

Брыков В.А., Кириллова О.Н., Кухлевский А.Д., Полякова Н.Е., Скурихина Л.А. Анализ изменчивости митохондриальной ДНК у кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) в популяциях рек Приморья и Сахалина // Генетика. 2000. Т. 36. №10. С. 1388-1393.

Брыков В.А., Полякова Н.Е., Прохорова А.В. Филогенетический анализ кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) в азиатской части ареала, основанный на изменчивости митохондриальной ДНК // Генетика. 2003. Т. 39. №1. С. 75-82.

Варнаевская Н.В. Генетическая дифференциация популяций тихоокеанских лососей. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 2006. 488 с.

Вейр Б. Анализ генетических данных. М.: Мир, 1995. 399 с.

Ефремов В.В., Иванкова Е.В., Генетическая изменчивость популяций кеты Приморья // Вопросы рыболовства. 2002. Т. 3. №4(12). С. 654-666.

Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 267 с.

Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Информационный Вестник ВОГиС. 2006а. Т. 10. №1. С. 74-96.

Животовский Л.А. Эколого-генетические принципы разведения тихоокеанских лососей. Сб. Мат. Междунар. науч. сем. «Современные проблемы лососевых рыбоводных заводов Дальнего Востока». Всемирный фонд дикой природы (WWF). Петропавловск-Камчатский, 2006б. С. 153-159.

Животовский Л.А., Афанасьев К.И., Рубцова Г.А. и др. О создании базы ДНК-данных для решения проблем воспроизводства, идентификации и сертификации популяций тихоокеанских лососей на примере кеты о. Итуруп // Вопросы рыболовства. 2008. №1. С. 96-109.

Макоедов А.Н. Кариология, биохимическая генетика и популяционная фенетика лососевидных рыб Сибири и Дальнего Востока: сравнительный аспект. М.: УМК «Психология», 1999. 291 с.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984. 480 с.

Полякова Н.Е., Семина А.В., Брыков В.А. Изменчивость митохондриальной ДНК кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) и ее связь с палеогеологическими событиями в северо-западной части Пацифики // Генетика. 2006. Т. 42. №10. С. 1388-1396.

Рубцова Г.А., Афанасьев К.И., Малинина Т.В. и др. Дифференциация популяций кеты по микросателлитным и аллозимным маркерам // Генетика. 2008. (№7, в печати).

Салменкова Е.А., Алтухов Ю.П., Викторovsky Р.М. и др. Генетическая структура популяций кеты, размножающихся в реках Дальнего Востока и Северо-востока СССР // Журнал общей биологии. 1986. Т. XLVII. №4. С. 529-549.

Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Алтухов Ю.П. Географическое исследование популяций кеты, *Oncorhynchus keta* (Walbaum), в азиатской части видовой ареала // Генетика. 1992. Т. 28. №1. С. 76-92.

Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Рослый Ю.С. и др. Генетическая дифференциация кеты бассейна Амура // Генетика. 1994. Т. 30. №4. С. 518-528.

Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Афанасьев К.А., Рубцова Г.А. Генетическое разнообразие азиатской кеты *Oncorhynchus keta* (Salmonidae, Salmoniformes) и динамика генофондов сахалинских популяций при искусственном воспроизводстве // Вопросы ихтиологии. 2008. Т. 48. №3. С. 361-373.

Смирнов Б.П., Леман В.Н., Шульгина Е.В. Заводское воспроизводство тихоокеанских лососей в России: современное состояние, проблемы и перспективы. Сб. Мат. Междунар. науч. сем. «Современные проблемы лососевых рыбоводных заводов Дальнего Востока». Всемирный фонд дикой природы (WWF). Петропавловск-Камчатский, 2006. С. 16-26.

Beachem T.D., Withler R.E., Gould A.P. Biochemical genetic stock identification of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Southern British Columbia // Can. J. Fish. And Aquat. Sci. 1985. V. 42. №3. Pp. 437-448.

Guo S.W., Thompson E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics. 1992. V. 48. Pp. 361-372.

Jin-Ping Chen, Da-Jing Sun, Chong-Zhi Dong 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. Version 1.0 (d16c). 2001, Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>

Okazaki T. Genetic study on population structure in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) // Bul. Far Seas Fish. Lab. 1982. №19. Pp. 25-113.

Sato S., Kojima H., Ando J. et al. Genetic population structure of chum salmon inferred from mitochondrial DNA sequence variation // Environmental Biol. Fishes. 2004. V. 69. Pp. 37-50.

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. High genetic heterogeneity in chum salmon in Western Alaska, the contact zone between northern and southern lineages // Trans. Am. Fish. Soc. 1999. V. 128. Pp. 58-87.

Seeb L.W., Crane P.A., Kondzela C.M. et al. Migration of Pacific Rim chum salmon on the high seas: insights from genetic data // Environmental Biol. 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.

Wilmot R.L., Kondzela C.M., Guthrie C.M., Masuda M.M. Genetic stock identification of chum salmon harvested incidentally in the 1994 and 1995 Bering Sea trawl fishery // N. Pac. Anadr. Fish. Comm. Bull. 1998. V. 1. Pp. 285-299.

Winans G.A., Aebersold P.B., Urava S., Markovstev V.G. Genetic stock identification of chum salmon: new data for 16 Asian population // (INPFC doc.) National Marine Fisheries Service, Northwest Fisheries Center. 1990. 23 p.

Yoon M., Sato S., Seeb J.E. et al. Genetic variation among chum salmon populations in Pacific Rim inferred from the mitochondrial and microsatellite DNA analyses // NPAFC doc.898. 2005.

Yoon M., Sato S., Seeb J.E. et al. Genetic variation among Pacific Rim chum salmon populations inferred from the microsatellite DNA analysis // NPAFC Doc. 964. 2006. 20p.

Zaykin D., Zhivotovsky L., Weir B.S. Exact tests for association between alleles at arbitrary numbers of loci. In: «Human Identification: The Use of DNA Markers». Kluwer Acad. Publ. London: 1995, 169-178 (reprinted from *Genetica* (Netherlands) 96: 169-178, 1995).

**MICROSATELLITE DNA VARIATION IN CHUM SALMON POPULATIONS
(*ONCORHYNCHUS KETA* WALBAUM) FROM SAKHALIN ISLAND HATCHERIES**

© 2009 y. M.V. Shitova¹, K.I. Afanasiev¹, G.A. Rubtsova¹, T.V. Malinina¹,
S.V. Sidorova², L.A. Zhivotovsky¹

1 – Vavilov's Institute of General Genetics, RAS

2 – FSE «Sakhalinrybvod»

Population samples of chum salmon from the hatcheries of Sakhalin Island genetically differentiate at ten microsatellite markers ($p < 0,001$). Populations from southwestern Sakhalin are least heterogeneous, having lesser number of alleles and lesser heterozygosity. Genetic differentiation of the populations studied is in agreement with their geography: in a plot of principal components, they form distinct groups that correspond to four regions of Sakhalin Island (south-western, southern and south-eastern, eastern, and north-eastern). This indicates genetic identity of chum salmon of each of these regions that remain to exist despite gene flow between the hatcheries due to transplantation.