

На правах рукописи



**Афанасьев Павел Константинович**

**Популяционная идентификация кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) по  
микросателлитным маркерам**

03.02.07 – генетика

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2013

Работа выполнена в лаборатории генетических проблем идентификации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

**Животовский Лев Анатольевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук

**Милишников Александр Николаевич**

Институт проблем экологии и эволюции имени А. Н. Северцова РАН, ведущий научный сотрудник

кандидат биологических наук

**Салменкова Елена Александровна**

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное унитарное предприятие Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии ФГУП «КамчатНИРО», г. Петропавловск - Камчатский

Защита состоится « 7 » ноября 2013 г. в 13<sup>00</sup> час. на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, по адресу: Москва, 119991, ГСП-1, ул. Губкина, д 3. Тел.: 499 135-62-13, ( 499 135-14-31, [aspirantura@vigg.ru](mailto:aspirantura@vigg.ru) ). Факс: (499) 132-89-62.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Автореферат разослан «23» апреля 2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



**Синельщикова Татьяна Аркадьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Промысел кеты является важнейшей отраслью экономики российского Дальнего Востока. Воспроизводство стад кеты осуществляется как естественным путем, так и искусственно на лососевых рыбоводных заводах (ЛРЗ). В России в последние годы проявляется все больший интерес к разведению именно кеты. В связи с тенденцией к увеличению объемов промысла и искусственного разведения, возрастает потребность решения вопросов принадлежности, как отдельных рыб, так и выборки, к тем или иным нерестовым группировкам, к естественным популяциям или искусственным стадам. Это могут быть проблемы, связанные с необходимостью определения популяционной принадлежности рыб при вылове на путях миграции, при определении состава уловов на ставных неводах, выявлении сезонных или экологических рас, а также и в спорных вопросах о происхождении уловов или при экологической сертификации морского промысла (Животовский и др. 2010). С каждым годом необходимость решения этих вопросов приобретает всё большую актуальность. При этом важно определить не только процентный популяционный состав исследуемой группы рыб в улове, но и популяционную принадлежность каждой отдельной особи. Последнее необходимо при соотнесении биологических характеристик рыб с местом происхождения, полом, возрастом, размерами и т.п.

Для решения упомянутых вопросов встает задача нахождения наиболее подходящих для этого генетических маркеров, способных обеспечить необходимую точность при идентификации отдельных рыб или выборки по их популяционной принадлежности.

Животовский (2010) сформулировал следующие принципы популяционно-генетических исследований тихоокеанских лососей при создании популяционных баз ДНК-данных, наиболее важными из которых для целей нашего исследования являются следующие два:

- 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 принести важную дополнительную информацию.

- 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.

В лаборатории генетических проблем идентификации Института общей генетики РАН разработан и используется набор из десяти микросателлитных локусов

кеты (Афанасьев и др. 2008, 2011; Животовский и др. 2008-2010; Рубцова и др. 2008; Шитова 2009). Данный набор с достаточной точностью дифференцирует региональные группировки кеты, а также крупные популяционные группировки в пределах регионов. Для надежной идентификации особей, принадлежащих к географически близкорасположенным группировкам, точность идентификации при использовании набора из этих десяти микросателлитных локусов недостаточна. Один из способов увеличения разрешающей способности метода – расширение используемого набора генетических маркеров.

В перспективе использование расширенного набора микросателлитных локусов позволит с высокой точностью определять принадлежность особей кеты в смешанных уловах.

Такой набор маркеров позволит полнее представить картину популяционной структуры и миграционных процессов, характерных для кеты российского Дальнего Востока, а также рационализировать промысел и воспроизводство этого ценного вида рыбы.

### **Цель исследования**

Цель данной работы – разработать набор микросателлитных маркеров, на основе ранее используемого в лаборатории, позволяющий с высокой точностью идентифицировать отдельных особей и локальные популяционные группировки кеты российского Дальнего Востока.

### **Задачи исследования**

- 1) Расширить существующий набор микросателлитных маркеров.
- 2) Оценить надежность идентификации особей кеты по их популяционной принадлежности на основе разработанных методик и собранного материала по кете.
- 3) Оценить разрешающую способность метода с разными наборами микросателлитных маркеров.

### **Научная новизна**

Впервые данные по микросателлитной изменчивости кеты российского Дальнего Востока использованы с целью популяционной идентификации как отдельных особей, так и их группировок. Проведена оценка изменения точности идентификации при расширении количества используемых микросателлитных маркеров. В ходе работы был апробирован ряд локусов, ранее не используемых на кете. Проведено сравнение компьютерных программ, позволяющих проводить популяционную идентификацию особей на основе данных о микросателлитной изменчивости. На примере смешанных траловых уловов кеты в Беринговом и Охотском морях, показана возможность применения разработанной методики популяционной идентификации кеты. Существующая база микросателлитных данных по кете расширена с привлечением материала по кете Аляски.

### **Практическая значимость**

Проведена оценка точности идентификации при использовании разных наборов генетических маркеров. С использованием расширенного набора микросателлитных маркеров показано стабильное увеличение точности идентификации по сравнению с ранее используемым набором локусов. Проведён сравнительный анализ компьютерных программ, позволяющих осуществлять популяционную идентификацию на основе данных о генетической изменчивости особей. Оценена генетическая структура популяций на основе расширенного набора микросателлитных локусов. Достигнута высокая точность (до 95%) идентификации для отдельных нерестовых группировок кеты.

### **Апробация результатов**

Основные результаты были представлены на международной практической конференции «Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб» (г. Санкт-Петербург, 20-22 апреля 2010г.), Международной молодежной конференции "Популяционная генетика: современное состояние и перспективы", посвященной памятной дате - 75-летию со дня рождения академика Ю.П.Алтухова (г. Москва, 17-18 ноября 2011г.), конференции, посвященной 80-летию юбилею ФГУП «КамчатНИРО» (г. Петропавловск-Камчатский, КамчатНИРО, 26-27 сентября 2012г.).

### **Декларация личного участия автора**

Автор участвовал в экспедиции по сбору образцов на Камчатке, самостоятельно проводил выделение ДНК части образцов, проводил микросателлитный анализ исследованных образцов. Автор лично проводил статистическую обработку и оформление результатов. Построение UPGMA - дендрограммы с бутстрэп-поддержкой узлов ветвления проводилось совместно с к.б.н. Шитовой М.В. Подбор альтернативных праймеров к исследуемым локусам проводился совместно с Шайхаевым Е.Г.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 113 страницах и содержит следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Выводы, Список цитируемых источников, включающий 156 ссылок, и одно Приложение. Работа содержит 13 рисунков и 15 таблиц.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Материал.** Первым этапом работы было проведение теоретического исследования возможных последствий расширения используемого набора микросателлитных локусов. Оценка проводилась на основе имеющихся в лаборатории «Генетических проблем идентификации» ИОГен РАН данных об изменчивости кеты по 10 микросателлитным маркерам. Изменение точности идентификации оценивалось на основе выборок из р. Курилка и р. Рыбацкая (о. Итуруп). Точность популяционной идентификации рассчитывалась с использованием

сначала одного локуса, затем двух локусов, трёх локусов и т.д. до десяти. На каждом этапе оценка точности проводилась со всеми возможными комбинациями 10 локусов, и рассчитывалось среднее значение точности идентификации. На основе полученных значений точности идентификации была построена кривая изменения точности идентификации. При построении кривой, прогнозирующей возможное изменение точности идентификации при дальнейшем увеличении числа используемых маркеров, в программе Microsoft Excel был использован логарифмический метод аппроксимации и рассчитана величина достоверности аппроксимации  $R^2$ .

Для реализации основной цели исследования, при расширении существующего набора микросателлитных локусов, было апробировано более 70 пар праймеров к 33 микросателлитным локусам, впервые обнаруженным на различных видах лососёвых родов *Oncorhynchus* и *Salmo*. Апробация праймеров проводилась в амплификаторе Veriti фирмы “Applied Biosystems” США при различных температурах отжига праймеров. По результатам апробации было выбрано 6 полиморфных, наиболее удобных для дальнейшей работы микросателлитных локусов (табл. 1).

Таблица 1. Список локусов, выбранных для дальнейшей работы.

Локус	Размер продукта ПЦР (п.н.)	Кол-во аллелей	Источник информации о последовательности праймеров
<i>Oki23</i>	135-171	4	Gharrett et al. 2007
<i>Oki10</i>	117-235	34	Smith et al. 1998
ОММ1037	168-188	6	Rexroad III et al. 2002
<i>One104</i>	117-237	27	Gharrett et al. 2007
<i>Ots102</i>	155-211	10	Nelson et al. 1999
<i>OtsG85</i>	122-210	19	Williamson et al. 2002

Критериями отбора локусов, помимо наличия полиморфизма, была надежность амплификации и размер продуктов амплификации, пригодный для анализа в полиакриламидном геле.

В ходе работы было проанализировано 22 выборки производителей кеты, образцы которых были собраны лабораторией генетических проблем идентификации в 2006-2009 гг. в период анадромных миграций на озерах и реках российского Дальнего Востока, а также две выборки с Приморья, переданные Л.А. Животовскому В.А. Брыковым. Кроме того, исследовали переданные Л.А. Животовскому А.В. Бугаевым (КамчатНИРО) по линии НРАФС образцы кеты Северной Америки (2012 г.). В работу вошли выборки с о. Сахалин, о. Итуруп, о. Кунашир, п-ова Камчатки, Чукотки, Приморья и Аляски. Места сбора образцов указаны на рис. 1.

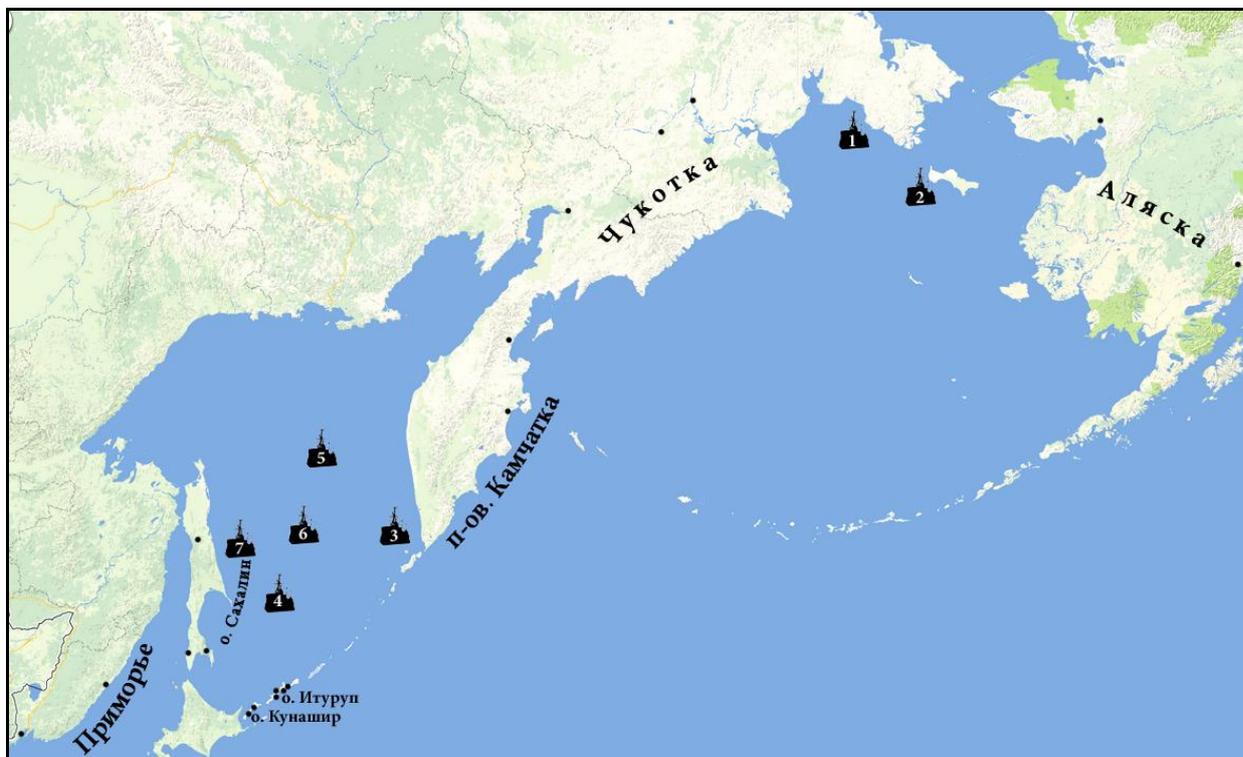


Рис. 1. Места взятия выборок, использованных в исследовании: о. Итуруп: оз. Сопочное и руч. Порожистый; р. Курилка; р. Рыбацкая; р. Рейдовая; оз. Куйбышевское; о. Кунашир: р. Илюшина; р. Серноводка; о. Сахалин: ЛРЗ «Калининский»; ЛРЗ «Охотский»; ЛРЗ «Адо-Тымовский»; Камчатка: р. Камчатка; р. Пенжина; р. Дранка; Приморье: р. Нарва; р. Аввакумовка; Чукотка: р. Белая; р. Анадырь, пос. Марково; Аляска: Tubitulik river; Salmon river. Выборки с тралений (обозначено силуэтом корабля): 1 – Трал №16, 2 – Трал №20, 3 – Трал №83, 4 – Трал №130, 5 – Трал №143, 6 – Трал №164, 7 – Трал №198.

Для разработки методики определения состава смешанных выборок использовались образцы кеты с тралений, проводимых НИС «Профессор Кагановский» в Беринговом и Охотском морях в период с августа по сентябрь 2011 года, переданные Л.А. Животовскому А.В. Бугаевым (КамчатНИРО). Места сбора образцов с тралений указаны на рис. 1.

**Методы.** Выделение тотальной ДНК из ткани мышц, печени или плавников, зафиксированных спиртом, проводилось по стандартной методике с помощью набора реактивов «Diatom DNA Prep» фирмы ООО «Лаборатория Изоген» (Россия). Для ПЦР-амплификации использовали лиофилизированные наборы GenPak PCR Core (ООО «Лаборатория Изоген», Россия), к которым добавляли 5 мкл смеси праймеров (конечная концентрация каждого - 0,5 мкМ) и 5 мкл исследуемой ДНК.

Амплификация микросателлитных локусов проводилась в термоциклере Veriti фирмы “Applied Biosystems” США. Аликвоты амплифицированных продуктов разделяли в вертикальном блоке 6% неденатурирующего полиакриламидного геля в 0,5x TBE буфере pH 8,0 (Маниатис и др., 1992) при 300в в течение 2-5 часов.

Полученные электрофореграммы визуализировали путем окрашивания бромистым этидием (5 мкг/мл, 10-15 мин) и фотографировали в УФ-свете на ультрамикроскопе. В качестве маркеров длин фрагментов использовали ДНК плазмиды pBr322, обработанную рестриктазой HaeIII, HpaII. Размеры аллелей по каждому локусу определяли с использованием программы 1D Image Analysis Software Version3,5 фирмы «Кодак».

**Статистическая обработка результатов.** Расчет частот аллелей, значений ожидаемой ( $H_E$ ) и наблюдаемой ( $H_O$ ) гетерозиготности, среднего числа аллелей на локус, индекса фиксации ( $f$ ) (Вейр, 1995), межпопуляционной дифференциации ( $\theta_P$  (*Theta-P*),  $F_{ST}$ ) (Вейр, 1995), а также проведение статистических тестов на соответствие наблюдаемых по каждому локусу генотипических распределений равновесию Харди-Вайнберга осуществляли с использованием программ GDA (Lewis, Zaykin, 2001) и GenAlEx6 (Peakall, Smouse, 2006 <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>). Определение возможных причин отклонений от равновесия Харди-Вайнберга проводилась в программе MicroChecker v.2.2.3 (Cock Van Oosterhout et al., 2004). Построение UPGMA дендрограммы с бутстрэп-поддержкой узлов ветвления проводилось в программе PHYLIP (Felsenstein, 2007), бескорневой полигенетической сети в программе SpleetsTree 4.6 (D. H. Huson and D. Bryant, 2006). Тест на принадлежность к популяции (Hansen et al., 2001; Banks et al., 2003) методом Rannala & Mountain (Rannala, Mountain, 1997) проводился в программах GenClass2 (Piry et al., 2004), ONCOR (Anderson, Waples, Kalinovski, 2007), WhichRun 4.1 (Will Eichert ©1999) и SPAM 3.7b (Gene Conservation Laboratory, Alaska Department of Fish and Game).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Результаты теоретической оценки расширения набора маркеров

По результатам проведенной теоретической оценки возможного влияния расширения набора используемых микросателлитных маркеров на точность идентификации кеты о. Итуруп был построен график, представленный на рис. 2.

Из графика видно, что точность идентификации возрастает с увеличением числа используемых микросателлитных маркеров. Логарифмическая кривая графика, отражающая теоретически возможный рост точности идентификации, построена с высоким значением достоверности аппроксимации ( $R^2=0,92$ ). Наиболее значительно точность идентификации увеличивается при переходе от одного к двум и трем используемым маркерам. При переходе от четырнадцати к пятнадцати, шестнадцати и более маркерам, точность идентификации увеличивается медленно, лишь далее асимптотически приближаясь к значению в 100%.

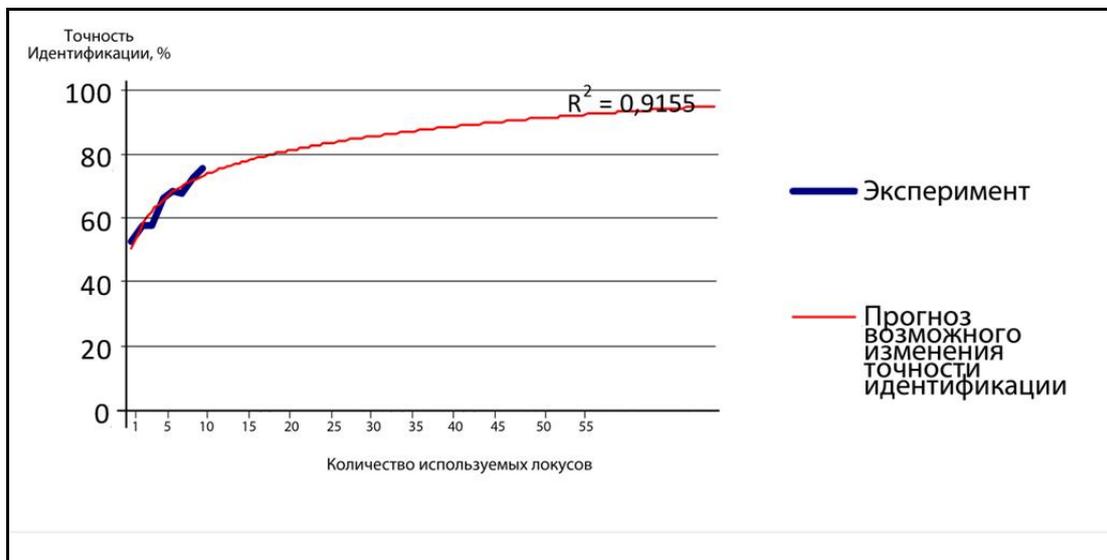


Рис. 2. Теоретическая оценка возможного влияния расширения набора используемых микросателлитных маркеров на точность популяционной идентификации.

Таким образом, в целях популяционной идентификации оптимальное число микросателлитных маркеров, которое позволяет с разумными затратами обеспечить увеличение точности идентификации, варьирует в пределах от 14 до 18. Проведенная теоретическая оценка дополнительно подтвердила предположение о возможности увеличения точности идентификации путём расширения набора маркеров.

### Характеристика исследованных микросателлитных локусов

Размеры ПЦР-продуктов исследованных локусов колебались от 110 п.н. до 240 п.н. Число обнаруженных аллелей отобранных локусов в исследованных популяциях колебалось от 4 (*Oki23*) до 34 (*Oki10G*). Среднее число аллелей на локус в целом по всем выборкам составило 10 аллелей. Наибольшей дифференцирующей способностью, среди шести новых локусов, в исследованных популяциях кеты характеризовался локус *Oki23* (значение *Theta-P* составило 0,096), вторым показал себя локус *Ots102* (значение *Theta-P* = 0,060), и на третьем месте оказался локус *Omm1037* (значение *Theta-P* = 0,065). Среднее значение *Theta-P* по всем локусам составило 0.057 с доверительным интервалом: нижним пределом = 0,04; верхним = 0,08;  $\alpha=0,05$ . Сравнение значений *Theta-P* в разных регионах при использовании наборов из 10 и 16 локусов показали, что оценка степени межпопуляционной дифференциации изменяется как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения, оставаясь в среднем для обоих наборов практически одинаковой, что говорит о взаимной адекватности этих наборов локусов (табл. 2). При этом доверительные интервалы оценок степени межпопуляционной дифференциации при использовании набора из 16 локусов по сравнению с набором из 10 локусов в некоторых регионах сократились.

Таблица 2. Значения степени дифференциации  $\Theta$ -P в разных регионах при использовании наборов из 10 и 16 микросателлитных локусов. \*-недостовверные значения  $\Theta$ -P

Регион	10 локусов	Доверительные интервалы ( $\alpha=0,05$ )	16 локусов	Доверительные интервалы ( $\alpha=0,05$ )
Курильские о-ва	0.016	0.011	0.020	0.020
		0.020		0.027
Приморье	0.040	0.020	0.034	0.020
		0.075		0.058
о. Сахалин	0.045	0.022	0.045	0.027
		0.076		0.066
Камчатка	0.025	0.017	0.026	0.016
		0.034		0.042
Чукотка	0.006*	-0.000	0.002*	-0.003
		0.013		0.008
Аляска	0.023	0.010	0.017	0.008
		0.032		0.024
По всем выборкам	0.064	0.041	0.057	0.040
		0.095		0.078

### Дифференциация исследованных популяций

На основе частот аллелей 16-ти микросателлитных локусов была построена бескорневая дендрограмма, представленная на рис. 3.

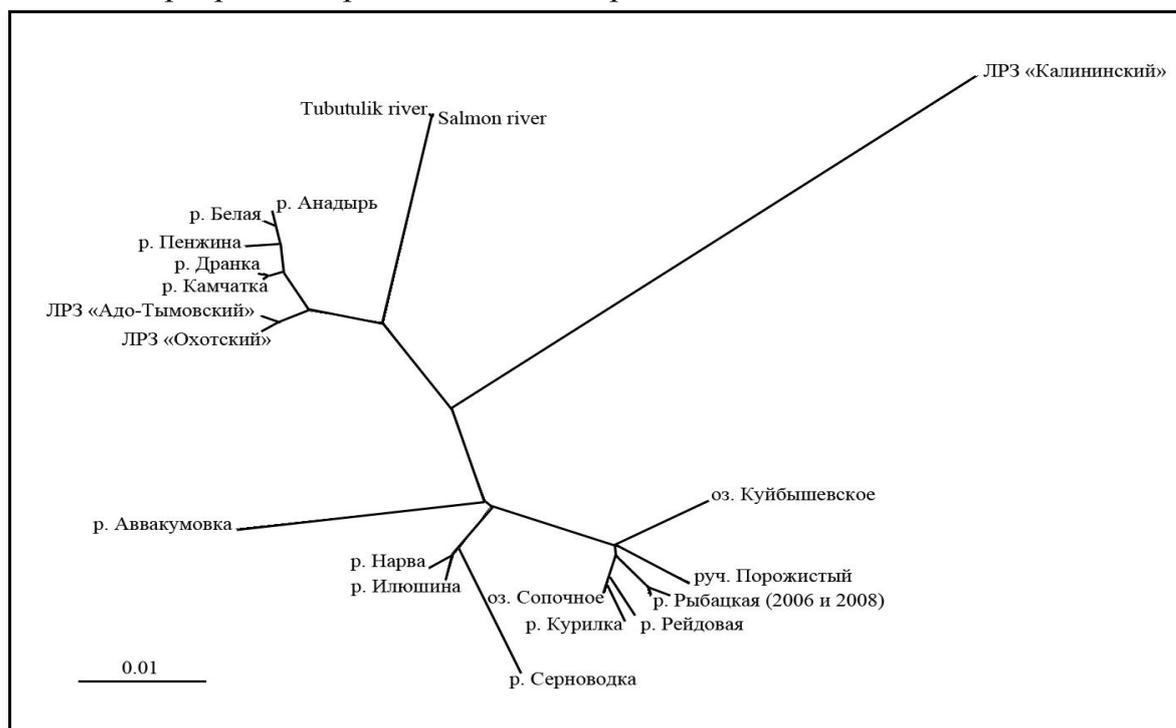


Рис. 3. Бескорневая дендрограмма исследованных выборок, построенная на основе частот аллелей 16 микросателлитных локусов кеты.

На дендрограмме видно, что выборки формируют две большие группы: - группа выборок северной части Тихого океана, куда вошли выборки, образующие три подгруппы: 1) кета о-ва Сахалин, 2) кета Аляски, 3) кета Камчатки и Чукотки;

- группа выборок более южной части Тихого океана, в которую вошли две подгруппы: 1) кета Итурупа и 2) кета Кунашира и Приморья. Отдельно от всех прочих расположена выборка ЛРЗ «Калининский» с Юго-Западного Сахалина. Представленная дендрограмма соответствует выделенным по глобальной базе данных группировкам южной, восточно-сахалинской и северной кеты азиатского побережья (Животовский 2010).

На основе данных об изменчивости кеты по 16 микросателлитным локусам в программе PHYLIP v. 3.6 нами была построена консенсусная UPGMA дендрограмма с проведением бутстрэп-тестирования узлов ветвления (рис. 4).

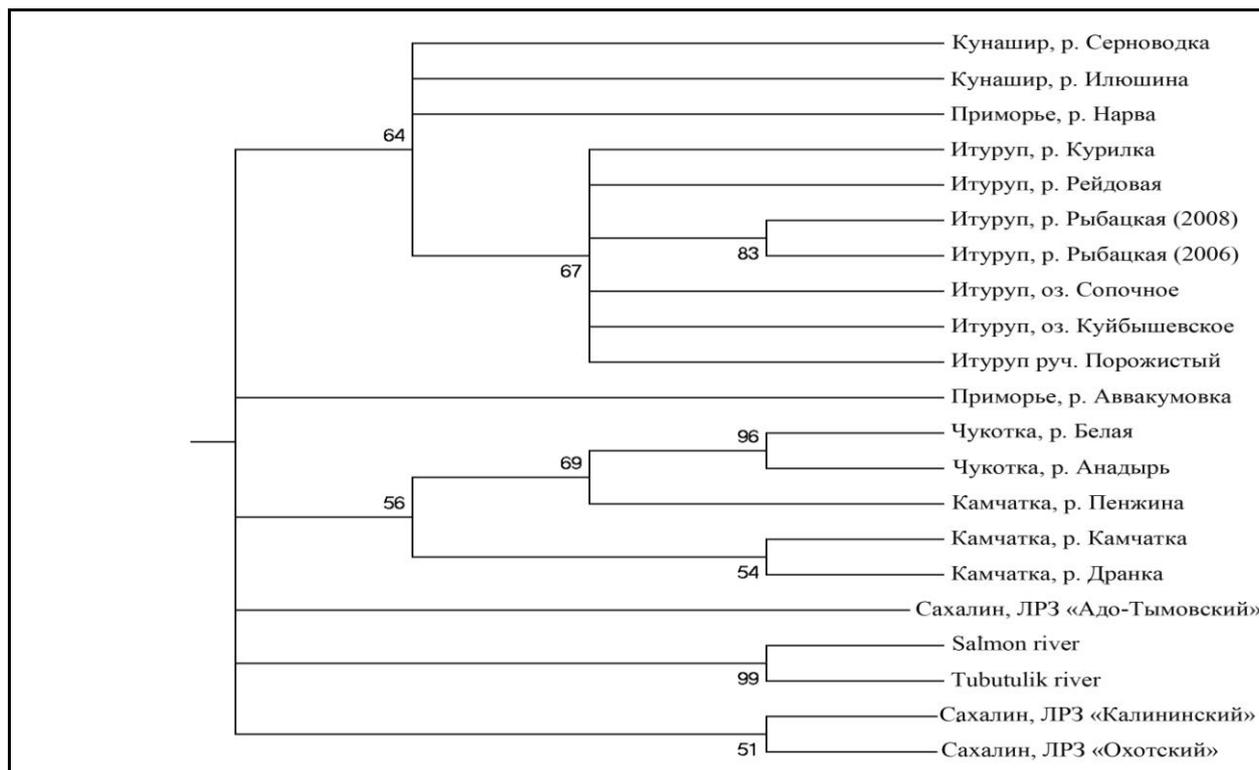


Рис. 4. Консенсусная UPGMA дендрограмма.

На консенсусной дендрограмме выборки формируют 5 основных групп, в целом соответствующие подгруппам предыдущей дендрограммы: о-в Итуруп, о-в Кунашир и р. Нарва, п-ов Камчатка и Чукотка, Аляска, о-в Сахалин. Однако есть и некоторые отличия. Например, ранее была показана обособленность популяций кеты юго-западного Сахалина от прочих популяций кеты на всём ареале обитания по аллозимным локусам (Алтухов и др., 1980; Салменкова и др., 1986; 1992; Иванкова и др., 2000; Варнавская, 2006). На консенсусном дереве (рис. 4) картина несколько отличается, что может быть связано с особенностью алгоритма при построении дендрограммы.

Для более разносторонней характеристики популяционной дифференциации исследованных выборок кеты по 16 микросателлитным локусам нами была построена бескорневая полигенетическая сеть, представленная на рис. 5.

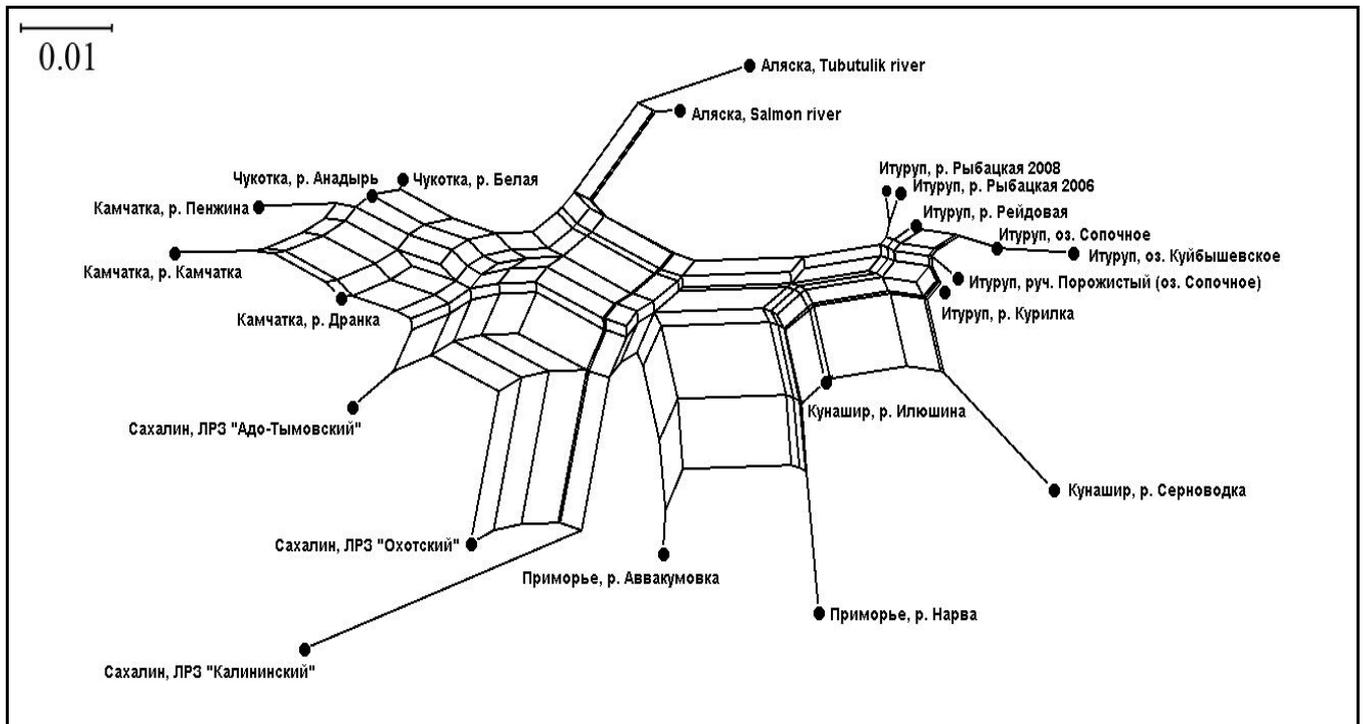


Рис. 5. Бескорневая полигенетическая сеть, построенная в программе SpleetsTree 4.6 на основе данных о генетических дистанциях.

Построение сети проводилось на основе значений генетических дистанций с использованием компьютерной программы SpleetsTree 4.6.

Представленная генетическая сеть корректнее отражает популяционную дифференциацию изученных выборок кеты. Генетические дистанции между выборками выражены в длине линий. На рис. 5 видно, что выборки с о-ва Итуруп группируются вместе, образуя единый кластер кеты Итурупа. Отдельной группой расположены выборки с Аляски из рек Tubutulik и Salmon. Они практически равноудалены от выборок с Итурупа и выборок с Чукотки. Следующая группа выборок – это выборки с Камчатки и Чукотки. Эта группа наиболее удалённая от выборок с острова Итуруп. На представленной полигенетической сети выборка с ЛРЗ «Адо-Тымовский» расположена между камчатской группой и выборкой с ЛРЗ «Охотский», но все-таки немного ближе к камчатской группе. Выборка с Юго-Западного Сахалина (ЛРЗ «Калининский») значительно удалена от «Охотской».

Учитывая всё вышесказанное можно сделать вывод, что добавленные 6 новых микросателлитных локусов дают ту же самую картину популяционной дифференциации кеты, которая была описана на основе данных по 10 микросателлитным локусам, ранее используемым в лаборатории генетических проблем идентификации (Животовский 2010). Это говорит о том, что весь набор из 16-ти маркеров дает воспроизводимую картину дифференциации.

## **Оценка точности региональной идентификации при использовании различных программных продуктов**

Основываясь на результатах популяционной дифференциации исследованных выборок, оценка региональной идентификации проводилась по следующим географическим районам (с использованием новой базы данных по 16-ти локусам и общей базы по 10-ти локусам): Аляска (выборки с рек Tubutulik и Salmon); Юго-Западная Камчатка (ЮЗК) (выборки с рек Большая и Быстрая); Северная Камчатка (СК) (выборка с реки Пенжина); Северо-Восточная Камчатка (СВК) (выборка с реки Дранка); Река Камчатка (выборки из реки Камчатка); Чукотка (выборки с рек Белая и Анадырь); Северный Сахалин (СС) (выборка с ЛРЗ «Адо-Тымовский»); Восточный Сахалин (ВС) (выборки с ЛРЗ «Буюклы» и «Побединский»); Юго-Западный Сахалин (ЮЗС) (выборки с ЛРЗ «Сокольниковский», «Калининский» и «Ясноморский»); Юго-Восточный Сахалин (ЮВС) (выборки с ЛРЗ «Охотский», «Таранайский» и «Монетка»); Курильские острова (Курилы) (выборки с рек Илюшина, Рейдовая, Рыбацкая, Курилка и Серноводка; выборки с озёр Сопочное и Куйбышевское; выборка из ручья Порожистый); Приморье (выборки с рек Киевка, Аввакумовка и Нарва).

На первом этапе нами была проведена оценка точности генетической идентификации при использовании набора из десяти микросателлитных локусов. (В цели данной работы не входила оценка точности идентификации с набором из десяти микросателлитных локусов по всей базе данных, имеющихся в лаборатории генетических проблем идентификации). В этой связи, для проведения оценки, помимо выборок, исследованных также по шести новым локусам, в качестве базовых были добавлены следующие выборки: Приморье (р. Киевка 2002, 2003 гг.); о. Сахалин (ЛРЗ Сокольниковский 2004 г., ЛРЗ Ясноморский 2005 г., ЛРЗ Буюклы 2005 г., ЛРЗ Побединский 2005 г., ЛРЗ Таранайский 2004 г., ЛРЗ Монетка 2009 г.); р. Амур 2003 г.; Магадан (р. Оля 2002 г., р. Яна 2002 г.); п-ов Камчатка (р. Большая 2007 г., р. Быстрая 2007 г., р. Камчатка 2006 г.).

Далее в тексте совокупность этих выборок и перечисленных выше будет упоминаться как «расширенная база». При оценке точности идентификации по «расширенной базе» использовались данные о микросателлитной изменчивости десяти микросателлитных локусов, ранее использовавшихся в лаборатории генетических проблем идентификации.

Оценка точности региональной идентификации проводилась в четырёх программах: GenClass2; SPAM 3.7b; ONCOR; WhichRun 4.1.

Программа SPAM 3.7b не предусматривает возможность получения данных по индивидуальной идентификации для каждой особи в исследуемой выборке. В связи с этим, для сравнения с тремя другими программами мы проводили несколько анализов, каждый раз определяя принадлежность одной особи, предварительно исключив её из базовой выборки. Этот процесс требовал многократного создания нескольких входных файлов, и оказался очень трудоёмким и времязатратным. В

программе SPAM 3.7b мы оценили точность индивидуальной идентификации для 21 особи кеты (11 особей из выборки с р. Киевка и 11 особей с ЛРЗ Адо-Тымовский), и обработка даже такого небольшого объёма данных заняла значительное время. Полученные в SPAM 3.7b результаты индивидуальной идентификации особей в точности совпадали с результатами, полученными в программе GeneClass2.

Результаты оценки точности региональной идентификации в программе GeneClass2 с использованием «расширенной базы» представлены в табл. 3. GeneClass2 позволяет проводить индивидуальную и групповую идентификацию особей, удобен для работы, и имеет возможность представлять результаты в удобном для дальнейшей обработки формате.

Результаты оценки точности региональной идентификации в программе ONCOR представлены в табл. 4. Отмечено, что при использовании программы ONCOR точность идентификации для большинства регионов выше в сравнении с результатами, показанными программой GeneClass2. Тем не менее, в качестве инструмента для оценки точности идентификации по имеющейся в нашем распоряжении совокупности выборок ONCOR имеет явный недостаток. Внимательно изучив таблицу можно заметить, что общее число особей, использовавшихся при оценке точности идентификации, в программе ONCOR меньше, чем при использовании программы GeneClass2. Почему так происходит? Несмотря на то, что ONCOR и GeneClass2 основаны на одном и том же методе оценки, имеется значительное отличие в алгоритме работы самих программ. Программа ONCOR не может проводить идентификацию особей, для которых отсутствуют данные хотя бы по одному из микросателлитных локусов. На практике же при проведении генетической идентификации зачастую исследователю приходится работать с образцами не самого лучшего качества или деградировавшей ДНК, что может создать некоторые трудности при получении данных об изменчивости микросателлитных локусов, наиболее чувствительных к условиям ПЦР-амплификации.

Результаты проведённой оценки точности региональной идентификации в программе WhichRun 4.1 показали, что точность идентификации для большинства регионов ниже, чем при использовании программ GeneClass2 и ONCOR. Кроме того, результаты, полученные с использованием WhichRun 4.1, не согласуются с популяционной дифференциацией особей. Причиной этого может являться как особенность метода идентификации, используемого WhichRun 4.1, так и алгоритм работы программы.

В дальнейшем для проведения оценок точности идентификации нами была выбрана программа GeneClass2, как наиболее удовлетворяющая требованиям проводимой работы. Проведённое нами сравнение также позволяет рекомендовать компьютерную программу GeneClass2 для использования в работах по индивидуальной и групповой идентификации особей, на основе данных о микросателлитной изменчивости.

Таблица 3. Результаты оценки точности региональной идентификации «расширенной базы» в программе GeneClass2 на основе данных о микросателлитной изменчивости по 10 микросателлитным локусам

Какие выборки идентифицируем К какой популяции мы относим	Приморье	Курилы	ЮВС	ЮЗС	ВС	СС	Магадан	р. Амур	Чукотка	р. Камчатка	СК	СВК	ЮЗК	Аляска	Точность идентификации с учётом ошибки первого рода, %
Приморье	74	17	2	0	3	2	0	0	3	0	0	1	0	2	71.15
Курилы	18	396	9	2	4	1	6	1	2	2	3	0	1	9	87.22
ЮВС	2	8	115	14	7	4	4	4	1	3	0	1	0	1	70.12
ЮЗС	0	4	28	133	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	79.64
ВС	1	4	14	1	43	15	9	7	1	7	1	3	2	0	39.81
СС	1	2	7	0	11	17	2	2	2	0	0	2	2	0	35.41
Магадан	1	6	6	0	9	2	22	0	7	4	2	3	4	2	32.35
р. Амур	0	0	3	0	9	3	0	50	2	2	1	2	0	1	68.49
Чукотка	1	1	3	0	2	0	3	0	41	3	11	3	1	5	55.40
р. Камчатка	0	0	3	0	2	2	11	4	2	64	3	7	10	1	58.71
СК	0	2	0	0	2	0	1	0	7	1	23	1	11	3	45.09
СВК	0	0	1	0	2	1	3	2	3	3	0	20	6	0	48.78
ЮЗК	0	0	1	0	6	0	6	7	5	12	4	5	21	1	30.88
Аляска	1	3	4	0	0	2	5	1	2	0	0	0	5	70	75.26
Точность идентификации с учётом ошибки второго рода, %	74.74	89.39	58.67	88.66	43.00	34.00	30.55	64.10	52.56	63.36	47.91	41.66	33.33	72.91	

Таблица 4. Результаты оценки точности региональной идентификации «расширенной базы» в программе ONCOR на основе данных о микросателлитной изменчивости по 10 микросателлитным локусам.

Какие выборки идентифи- цируем  К каким популяция м относим	Приморье	Курилы	ЮВС	ЮЗС	ВС	СС	Магадан	р. Амур	Чукотка	р. Камчатка	СК	СВК	ЮЗК	Аляска	Точность идентификации с учётом ошибки первого рода, %
Приморье	47	15	0	0	3	2	0	0	0	0	0	1	0	1	71.15%
Курилы	11	391	6	2	3	1	1	0	2	2	0	0	1	3	87.22%
ЮВС	1	8	112	14	0	4	0	2	1	3	0	0	0	0	70.12%
ЮЗС	0	4	27	132	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	79.64%
ВС	1	3	14	1	43	16	3	5	1	7	1	3	2	0	39.81%
СС	0	2	7	0	11	14	1	1	1	0	0	2	2	0	35.41%
Магадан	0	6	5	0	9	2	11	0	6	4	2	3	4	0	32.35%
р. Амур	0	0	3	0	9	3	0	27	2	2	1	1	0	0	68.49%
Чукотка	1	1	3	0	2	0	2	0	30	3	8	2	1	1	55.40%
р. Камчатка	0	0	3	0	2	2	3	0	1	64	3	7	10	1	58.71%
СК	0	2	0	0	2	0	1	1	1	1	19	0	11	0	45.09%
СВК	0	0	1	0	2	1	1	0	1	3	0	17	6	0	48.78%
ЮЗК	0	0	1	0	6	0	2	1	4	12	2	4	21	0	30.88%
Аляска	1	3	3	0	0	2	1	1	1	0	0	0	5	11	75.26%
Точность идентификации с учётом ошибки второго рода, %	75.80	89.88	60.54	88.59	43.43	29.16	42.30	71.05	58.82	63.36	52.77	42.50	33.33	64.70	

## Оценка изменения точности региональной идентификации с различными наборами используемых микросателлитных локусов

При проведении оценки точности идентификации с разными наборами микросателлитных локусов нами использовалась программа GeneClass2. Для проведения оценки изменения точности идентификации при использовании набора из десяти микросателлитных локусов, ранее использовавшихся в лаборатории, и смешанного набора из шестнадцати микросателлитных локусов (шесть микросателлитных локусов, исследованных в ходе данной работы, и десяти ранее использовавшихся) были использованы данные о микросателлитной изменчивости по реперным выборкам. Результаты оценок представлены в табл. 5 и 6. Как видно из таблиц, при добавлении к набору шести новых микросателлитных локусов, исследованных в данной работе, значение точности идентификации увеличивается во всех представленных регионах, за исключением Северной Камчатки, для которой точность идентификации осталась неизменной.

Применение критерия знаков (Оуэн Д.Б., 1966) показало статистическую значимость увеличения точности идентификации при использовании набора из 16 микросателлитных локусов в сравнении с набором из 10 локусов ( $\alpha=0,05$ ). Графически изменение точности идентификации представлено на рис. 6.

Из представленных рисунков и таблиц видно, что ошибки первого и второго рода имеют схожие значения. Наибольшее изменение ошибки идентификации при использовании набора из шестнадцати микросателлитных локусов в сравнении с набором из 10 локусов наблюдалось для выборок с южной части ареала кеты российского Дальнего Востока.



Рис. 6. Изменение точности идентификации с учётом ошибок идентификации первого и второго рода, при использовании наборов из 10 и 16 микросателлитных локусов

Таблица 5. Результаты оценки точности региональной идентификации по реперным выборкам в программе GeneClass2 на основе данных об изменчивости по 10 микросателлитным локусам.

Какие выборки идентифицируем К каким популяциям относим	Приморье	Курилы	ЮВС	ЮЗС	СС	Чукотка	р. Камчатка	СК	СВК	Аляска	Точность идентификации с учётом ошибки первого рода, %
Приморье	52	16	0	0	2	1	0	0	1	1	71.23
Курилы	20	406	3	1	2	4	3	3	0	10	89.82
ЮВС	0	5	28	4	7	0	4	0	3	1	53.84
ЮЗС	0	3	4	45	1	0	0	0	0	1	83.33
СС	1	2	6	0	30	3	2	0	2	0	65.21
Чукотка	2	2	2	0	0	45	1	14	4	6	59.21
р. Камчатка	0	0	5	0	2	3	31	1	8	0	62.00
СК	0	4	1	0	0	12	2	27	3	5	50.00
СВК	0	1	0	0	4	6	5	1	24	0	58.54
Аляска	1	4	1	0	2	4	1	2	3	72	80.00
Точность идентификации с учётом ошибки второго рода, %	68.42	91.65	56.00	90.00	60.00	57.70	63.27	56.25	50.00	75.00	

Таблица 6. Результаты оценки точности региональной идентификации по реперным выборкам в программе GeneClass2 на основе данных о микросателлитной изменчивости по 16 микросателлитным локусам.

Какие выборки идентифицируем К каким популяциям относим	Приморье	Курилы	ЮВС	ЮЗС	СС	Чукотка	р. Камчатка	СК	СВК	Аляска	Точность идентификации с учётом ошибки первого рода, %
Приморье	65	8	1	0	1	0	1	0	0	0	85.53
Курилы	5	421	1	1	1	1	2	2	0	6	95.68
ЮВС	2	5	39	2	3	0	2	1	2	0	69.64
ЮЗС	0	2	5	46	1	0	0	0	0	0	85.19
СС	0	2	3	0	34	2	0	0	3	2	73.91
Чукотка	1	1	0	0	1	49	1	11	4	7	65.33
р. Камчатка	0	0	1	0	3	4	34	3	7	0	65.38
СК	1	0	0	0	0	16	3	27	5	2	50.00
СВК	0	0	0	0	5	3	6	0	26	2	61.90
Аляска	2	4	0	1	1	3	0	4	1	77	82.80
Точность идентификации с учётом ошибки второго рода, %	85.53	95.03	78.00	92.00	68.00	62.82	69.39	56.25	54.17	80.21	

Наименьшее изменение точности идентификации было отмечено для Северной Камчатки, где она осталась неизменной. Причиной этого, вероятнее всего, является генетическое сходство популяций Северной Камчатки (р. Пенжина) и Чукотки, представленных в нашем исследовании. Значительный процент особей с Северной Камчатки определялись программой как чукотские особи и наоборот.

Изменение точности идентификации было значительно для Приморья, где ошибка первого рода уменьшилась почти вдвое, а ошибка второго рода уменьшилась более чем в два раза. Точность идентификации значительно увеличилась для особей с Курильских островов и Юго-Восточного Сахалина.

Точность идентификации, по результатам проведённой оценки, изменилась неравномерно, в отличие от описанной выше теоретической оценки. Увеличение точности идентификации с учётом ошибки первого рода для Чукотки составило 6,12%, а для Северо-Восточной Камчатки в два раза меньше 3,36%, при близких исходных значениях. Очевидно, что неравномерное изменение точности идентификации при расширении набора используемых микросателлитных локусов связано с их индивидуальной дифференцирующей способностью для различных популяций. В этой связи, в случае необходимости проведения популяционной идентификации особей в пределах небольшого региона, в целях экономии средств, могут быть отобраны локусы, обладающие наибольшей степенью дифференциации для этого региона.

Приведенные выше результаты оценки изменения точности идентификации при расширении набора микросателлитных маркеров позволяют сказать, что наиболее рационально использовать расширенный набор из шестнадцати микросателлитных локусов в целях идентификации кеты с южной части её ареала на Российском Дальнем Востоке. Расширенный набор микросателлитных локусов также может быть использован для более точной внутрирегиональной идентификации особей кеты. Результаты оценки также продемонстрировали, что использование дополнительных шести локусов, описанных в данной работе, в целях внутрирегиональной идентификации особей азиатской кеты с северных регионов является нецелесообразным ввиду незначительного увеличения точности идентификации при добавлении их к набору из ранее разработанных десяти микросателлитных локусов.

### **Определение состава смешанных траловых уловов с использованием расширенного набора микросателлитных локусов**

Заключительным этапом данной работы явилась методическая разработка по использованию расширенного набора из шестнадцати микросателлитных локусов и отработанной нами методики популяционной идентификации особей с использованием программы GeneClass2 для определения популяционного состава

смешанных выборок. Для этого была исследована часть материала с траловых уловов НИС «Профессор Кагановский», собранного в Беринговом и Охотском морях в сентябре и октябре 2011 года. В качестве базовых популяций были использованы реперные выборки, перечень которых был представлен ранее в разделе, посвящённом оценке точности региональной идентификации при использовании различных программных продуктов. Идентификация проводилась по принадлежности особей к следующим географическим регионам: Приморье (выборки с рек Аввакумовка и Нарва); Курильские о-ва (выборки с рек Илюшина, Рейдовая, Рыбацкая, Курилка и Серноводка; выборки с озёр Сопочное и Куйбышевское; выборка из ручья Порожистый); о. Сахалин (выборки с ЛРЗ «Адо-Тымовский», «Калининский» и «Охотский»); п-ов Камчатка (выборки с рек Камчатка, Дранка и Пенжина); Чукотка (выборки с рек Белая и Анадырь); Аляска (выборки с рек Tubutulik и Salmon).

Предварительно для перечисленных выше регионов была проведена оценка точности идентификации с использованием набора из шестнадцати микросателлитных локусов.

Всего в ходе данного этапа работы нами была проведена индивидуальная идентификация 92 особей кеты из 7 морских выборок. Каждая особь индивидуально идентифицировалась по принадлежности к одному из географических регионов, после чего для каждой из траловых выборок рассчитывался процент особей из разных регионов. Для оценки точности идентификации учитывалась ошибка первого рода, как соответствующая задаче идентификации смешанных уловов.

Результаты проведённой идентификации выборок с тралений представлены в табл. 7.

*Таблица 7. Результаты популяционной идентификации траловых выборок по 16 микросателлитным локусам (объяснение см. в тексте).*

Какие выборки идентифицируем	К каким популяциям относим	Курилы, %	Приморье, %	Сахалин, %	Камчатка, %	Чукотка, %	Аляска, %	Точность идентификации, %
Трал №16		40.00	20.00	20.00	20.00	0.00	0.00	89.02
Трал №20		46.20	23.10	0.00	15.40	0.00	15.40	89.04
Трал №83		0.00	9.10	9.10	72.70	9.10	0.00	78.68
Трал №130		38.10	0.00	14.30	38.10	9.50	0.00	87.18
Трал №143		23.10	0.00	30.80	30.80	7.70	7.70	86.73
Трал №164		8.30	0.00	8.30	58.30	16.70	8.30	86.73
Трал №198		10.00	0.00	20.00	40.00	20.00	10.00	86.73

Полученные результаты показывают, что в траловых выборках кеты из северной части Берингова моря преобладают особи с южной части ареала (скорее всего, с Южных Курил). Так в составе тралов №16 было идентифицировано 60% особей с южной части ареала, преимущественно с курильских островов (40%). Также в составе трала было идентифицировано 20% особей с Камчатки и 20% особей с о-ва Сахалин. В составе трала № 20 наблюдалась сходная картина. С южной части ареала почти 70% особей, 15% особей с Камчатки и 15% особей с Аляски.

Стоит также отметить, что с учётом точности идентификации особи кеты определённые программой как Сахалинские, Камчатские и Американские, возможно определены ошибочно. Также стоит отметить, что в тралах №16 и №20 отсутствовали чукотские особи. Вероятнее всего в период проведения тралений (август-сентябрь) чукотская кета уже мигрировала ближе к побережью полуострова.

С учетом данных Бугаева с соавторами (Бугаев и др., 2006) не исключено, что часть особей кеты, которая была идентифицирована нами как курильская и приморская, является японской кетой. Поскольку выборки японской кеты нет среди используемых нами базовых выборок, алгоритм указывает на Курильские острова и Приморье, как на ближайшие по генетическому профилю.

В составе выборки с юго-западного побережья Камчатки (трал №83), в которой присутствовали только сеголетки кеты, было идентифицировано подавляющее большинство камчатских особей (70%); кроме того было идентифицировано незначительное число особей с Приморья, о-ва Сахалин и Чукотки, что находится в пределах погрешности метода.

Представленные выше результаты практического применения метода, с одной стороны демонстрируя возможность идентификации смешанных траловых уловов кеты, с другой стороны имеются некоторые сложности в интерпретации полученных результатов. Рассчитанная точность идентификации даёт представление о возможном проценте ошибки, однако мы не имеем возможности сказать точно, какие из образцов были определены ошибочно. При определении состава улова в трале №198 программа идентифицировала часть рыб, как принадлежащих к популяциям с Аляски; вероятнее всего эти рыбы были идентифицированы использованным методом ошибочно (что согласуется с величиной ошибки первого рода), но мы не можем утверждать этого с абсолютной уверенностью. В данной работе мы лишь продемонстрировали возможность применения метода популяционной идентификации с разработанным набором из шестнадцати микросателлитных локусов, почему и был исследован ограниченный объем материала из траловых уловов. Некоторое искажение результатов идентификации может быть связано с использованием нами ограниченной реперной базы данных по 16 микросателлитным маркерам. В связи с этим встаёт проблема взаимной оптимизации увеличения базы реперных выборок и числа используемых генетических маркеров.

В заключение можно сказать, что представленный метод, безусловно, позволяет определять состав смешанных уловов кеты. Даже при использовании ограниченного набора реперных выборок и небольших по объёму смешанных выборок, используя данные о микросателлитной изменчивости кеты по шестнадцати микросателлитным локусам, мы с высокой вероятностью можем оценить, какие из региональных группировок кеты преобладают в исследуемой выборке.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан набор из шести микросателлитных локусов, который совместно с имеющимися десятью микросателлитными маркерами может быть успешно использован для популяционной идентификации одного из важнейших видов тихоокеанских лососей – кеты, а также для изучения её популяционной структуры.
2. Наиболее генетически дифференцированными являются популяции азиатской кеты южной части ареала (Южные Курилы и Приморье), наименее дифференцированы популяции Камчатки, Чукотки и охотоморского побережья материка.
3. Набор из 16 микросателлитных локусов увеличивает точность идентификации особей в сравнении с исходным набором из 10 локусов; для отдельных регионов ошибка идентификации уменьшается более чем в два раза. Наибольшая эффективность предложенного набора маркеров достигается при идентификации особей кеты по отношению к популяциям южной части ареала. Для кеты Курильских о-вов точность идентификации с использованием набора из 16 микросателлитных локусов составила более 95%.
4. Программа GeneClass2 является наиболее удовлетворяющей требованиям задач популяционной идентификации и удобной для использования.
5. Продемонстрирована возможность практического применения метода популяционной идентификации с использованием предложенного набора микросателлитных маркеров при определении состава смешанных уловов кеты.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **П.К. Афанасьев**, Л.А. Животовский. (2010) Разработка микросателлитных маркеров в целях идентификации кеты (*Oncorhynchus keta Walbaum*). В сб: Сборник статей международной практической конференции «Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб». Г.Санкт-Петербург 20-22 апреля.
2. **П.К. Афанасьев**. (2011) Расширение набора микросателлитных маркеров в целях идентификации кеты *Oncorhynchus keta (Walbaum)*. В сб: Сборник тезисов международной молодежной конференции "Популяционная генетика: современное состояние и перспективы", посвященной памятной дате - 75-летию со дня рождения академика Ю.П.Алтухова, 17-18 ноября. Москва: Цифровичок. С. 192-193.
3. **П.К. Афанасьев**, Л.А. Животовский. (2012) Расширение набора микросателлитных маркеров в целях идентификации кеты *Oncorhynchus keta (Walbaum)*. В сб: Материалы научной конференции, посвященной 80-летию юбилею ФГУП «КамчатНИРО». Петропавловск-Камчатский, 26-27 сентября 2012 г. КамчатНИРО. С. 389-395.

## Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК

1. **П.К. Афанасьев**, Г.А. Рубцова, М.В. Шитова, Е.Г. Шайхаев, и Л.А. Животовский.(2011) Расширение набора микросателлитных маркеров с целью повышения точности идентификации кеты. (*Oncorhynchus keta Walbaum*). Генетика. Москва. Т. 47. № 11. С. 1-7.