

Юрченко Андрей Александрович

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ
САХАЛИНСКОГО ТАЙМЕНЯ *PARANUSCHO PERRYI* BREVOORT
И ВОПРОСЫ ПРИРОДООХРАННОЙ ГЕНЕТИКИ ВИДА**

Специальность 03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2015

Работа выполнена в лаборатории генетических проблем идентификации Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетических проблем идентификации Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук», г. Москва

ЖИВОТОВСКИЙ Лев Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, заведующая кабинетом методов молекулярной диагностики, Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова Российской академии наук», г. Москва

ХОЛОДОВА Марина Владимировна

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики, Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», г. Москва

МЮГЕ Николай Сергеевич

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Защита состоится «24» декабря 2015 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук» по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31, электронный адрес отдела аспирантуры: aspirantura@vigg.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Татьяна Аркадьевна Синельщикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Среди всех лососевых рыб, обитающих в российской части Тихого океана, единственным видом, занесенным как в Красную Книгу Российской Федерации, так и в Красную Книгу Международного союза охраны природы (IUCN Red List, 2011) стал уникальный полупроходной вид семейства лососевых, сахалинский таймень *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856). Этот вид обладает рядом особенностей (частые миграции в пределах пресноводного водоема с выходом в побережье, долгий жизненный цикл, большие размеры), которые делают его крайне уязвимым к антропогенным воздействиям и изменениям климата. Выявление и описание популяционной структуры сахалинского тайменя с использованием молекулярных маркеров ДНК представляется неотложной задачей на пути создания эффективной программы по восстановлению и сохранению этого вида.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на российский и международный «краснокнижный» статус сахалинского тайменя, широкомасштабных исследований по выявлению его популяционной структуры и оценке уровней генетического разнообразия до настоящей работы не проводилось, за исключением анализа небольших выборок с очень ограниченной части ареала по локусам митохондриальной ДНК (Скурихина и др., 2013), а также трех работ по разработке микросателлитных и митохондриальных молекулярных ресурсов для дальнейших исследований (Hatakeyama et al., 2005; Korun et al., 2009; Shedko et al., 2013).

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является описание популяционно-генетической структуры сахалинского тайменя *Parahucho perryi* и разработка практических рекомендаций по сохранению популяционных генофондов вида на основе анализа молекулярных маркеров ДНК.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать эффективную панель микросателлитных маркеров ДНК для анализа популяционно-генетической структуры сахалинского тайменя *Parahucho perryi*.
2. Обеспечить выборки сахалинского тайменя с большей части ареала вида.
3. Генотипировать образцы ДНК сахалинского тайменя по разработанной панели микросателлитных локусов.
4. Провести статистический анализ внутри- и межпопуляционной генетической изменчивости сахалинского тайменя по микросателлитным локусам ДНК.
5. Секвенировать последовательности участков митохондриальных генов *Co-1* и *CytB*.
6. Провести филогеографический анализ на основе полиморфизма митохондриальных нуклеотидных последовательностей.
7. Выработать рекомендации по сохранению популяционных генофондов сахалинского тайменя на основе полученных результатов популяционно-генетического анализа.

Научная новизна работы. В данной работе впервые описывается генетическая структура популяций редкого эндемичного вида рыб сахалинского тайменя *Parahucho*

perryi с использованием репрезентативного набора ядерных (микросателлиты, 19 локусов), а также митохондриальных (2 фрагмента) маркеров. Для этого были исследованы уникальные выборки (473 образца), собранные на водоемах Дальнего Востока России, в том числе автором, непосредственно в ходе выполнения работы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, могут быть использованы для разработки эффективных, научно обоснованных планов по сохранению и восстановлению популяций сахалинского тайменя. Особенно важны полученные данные при планировании реинтродукции сахалинского тайменя, искусственном разведении вида, требующем учета популяционно-генетической структуры. С теоретической точки зрения, результаты могут быть использованы для сравнительной филогеографии рыб Дальнего Востока России, построения биогеографических гипотез.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Промежуточные и итоговые результаты работы были представлены автором на международной молодёжной конференции "Популяционная генетика: современное состояние и перспективы" (Москва, 2011), 5-ом всероссийском конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 2012), 16-ой и 17-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2012 - 2013), 20-й международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2013), конференции «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» (Ростов-на-Дону, 2013). Материалы исследования были представлены на итоговых годовых сессиях аспирантов ИОГен РАН в 2011 и 2012 годах. Апробация работы проходила 11 декабря 2014 года на семинаре отдела генетики популяций и природопользования ИОГен РАН.

Положения, выносимые на защиту.

1. Популяционно-генетическая структура сахалинского тайменя является иерархически организованной с высокими значениями популяционно-генетической дифференциации на разных уровнях иерархии.
2. Наблюдаемая по частотам ядерных маркеров ДНК дивергенция групп популяций вызвана скорее малой эффективной численностью и ограниченной частотой миграций между группами, обусловленной, в том числе, природно-географическими условиями мест обитания, чем долговременной изоляцией в ледниковых рефугиумах или современных местах обитания.
3. Работы по реинтродукции и искусственному разведению сахалинского тайменя должны учитывать особенности описанной генетической структуры популяций сахалинского тайменя во избежание деградации популяционных генофондов вида. Производители должны отбираться из того водоема, в котором планируется выпуск молоди. При невозможности отбора производителей из этого водоёма, они должны быть взяты из популяций того же зоогеографического региона, принадлежащих к одной генетической группе популяций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В разделе «Обзор Литературы» изложены литературные данные о современном и историческом ареале вида, филогенетических взаимоотношениях сахалинского тайменя а также биологии и миграционном поведении. Рассмотрены данные по сокращающейся численности сахалинского тайменя и основным угрозам виду. Кратко обсуждаются современные достижения природоохранной генетики.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор образцов для исследования

В работе использованы выборки, добытые в ходе многочисленных экспедиций на реках Дальнего Востока России в период с 1996 по 2012 годы. Выборки, взятые после занесения сахалинского тайменя в Красную книгу РФ и Сахалинской области, собирались прижизненно по принципу «поймал-отпусти» в экспедициях согласно разрешениям Росприроднадзора Российской Федерации и Сахалинской области, выданным в 2009-2012гг. ИОГен РАН (научный рук. Животовский Л.А.). Часть проб была получена в виде ихтиологических чешуйных коллекций, любезно предоставленных разными исследователями. Карта использованных выборок представлена на Рисунке 1.

Разработка панели микросателлитных локусов, генотипирование образцов и секвенирование фрагментов митохондриальной ДНК

Чтобы расширить панель микросателлитных локусов, доступных для анализа в вертикальном гель-электрофорезе, были созданы новые праймеры для опубликованных ранее локусов сахалинского тайменя, а также опробована амплификация на тотальной ДНК тайменя 21 микросателлитного локуса, из созданных изначально для других видов лососевых рыб. Шесть из них успешно амплифицировались и дополнили собой панель локусов для популяционно-генетических исследований сахалинского тайменя. Всего в работе использовалось 19 микросателлитных локусов ДНК.

Тотальная днк выделялась с помощью наборов Diatome DNA prep kit 200 (компания Изоген). 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 при следующем режиме: денатурация в течение 2 мин. при 94⁰С, 30 циклов, включающих 30 секунд денатурации ДНК-матрицы при температуре 94⁰С, 30 сек. отжига праймеров при 50-60⁰С и синтез новых цепей в течение 30 сек. при 72⁰С; далее следовала элонгация – 2 мин. при 72⁰С и охлаждение до 4⁰С. Аликвоты амплифицированных продуктов разделяли в вертикальном блоке 6% неденатурирующего полиакриламидного геля в 0.5x TBE буфере рН 8.0 (Маниатис и др., 1984) при 300В в течение 2-3.5 часов. Полученные электрофореграммы визуализировали путем окрашивания бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

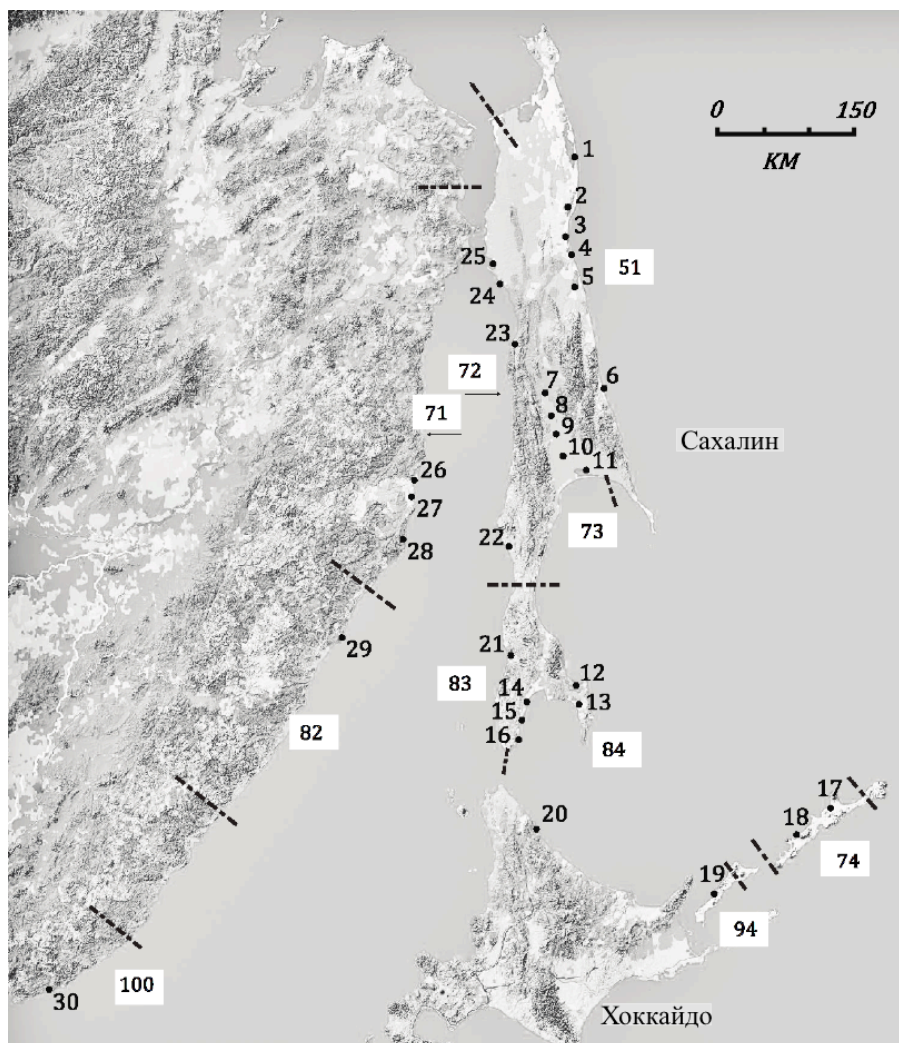


Рисунок 1. Карта выборок сахалинского тайменя. Номерами без выделения обозначены водоемы, номера в белых квадратах – зоогеографические регионы Дальнего Востока (по Мартыненко, 2007). Пунктирные линии – границы экорегионов. В скобках дан размер каждой выборки. 1: зал. Пильтун (8), 2: р. Вал (14), 3: р. Даги (40), 4: р. Тымь (11), 5: р. Набиль (20), 6: р. Лангери (10), 7: р. Поронай (11) и её притоки (8: Онорка (12), 9: Брусничная (11), 10: Ельная (21)), 11: оз. Невское (8), 12: оз. Тунайча (16), 13: оз. Большое Вавайское (28), 14: р. Урюм (3), 15: р. Ульяновка (11), 16: р. Могучи (6), 17: р. Лебедино (7), 18: р. Куйбышевка (7), 19: оз. Валентины (6), 20: р. Сарафуцу (9), 21: оз. Тайное (9), 22: оз. Айнское (60), 23: р. Агнево (13), 24: река и залив Виахту (42), 25: зал. Тык (10), 26: р. Улика (15), 27: р. Тумнин (26), 28: р. Коппи (24), 29: р. Самарга (9), 30: р. Киевка (6).

Амплификация и секвенирование митохондриальных фрагментов ДНК.

Для анализа митохондриальной ДНК сахалинского тайменя (103 образца) были выбраны два фрагмента: часть гена цитохромоксидазы-1 (*COI*) и цитохрома *b* (*CytB*), длиной 600 п.н. и 429 п.н. соответственно.

Статистический анализ данных

Популяционная дифференциация.

Для оценки значимости отклонений от равновесия Харди-Вайнберга в выборках по каждому из локусов использовался «Exact test» (Weir, 1990; Zaykin et al., 1995) в

программе GDA (Lewis, Zaykin 2001), с последующей корректировкой p -значений с помощью *sequential Bonferroni correction* (Rice, 1989). Для оценки отклонений от равновесия Харди-Вайнберга в выборках и популяциях усредненно по всем локусам использовался «*Global Test*» (Raymond, Rousset, 1995) в программе GenePop 4 (Rousset, 2008) на основе избытка и недостатка гетерозигот в популяции, с числом марковских цепей (MCMC) = 10000. Для тестирования эффекта размера выборки, все особи из одного водоема объединялись, и вновь тестировались. Значимость отклонений была скорректирована с помощью *sequential Bonferroni correction* (Rice, 1989).

Кластеризация мультилокусных генотипов и выборок.

Анализ в пространстве главных компонент производился в программе *PAST* (Hummer et al., 2009) с использованием ковариационной матрицы, размах вариации, приходящийся на каждую из компонент, тестировался с помощью 1000 бутстреп-репликаций. Для построения дерева методом ближайшего соседства (*Neighbor-Joining*), межиндивидуальные попарные дистанции (*Dps*) были рассчитаны в программе *MSA 4.05* (Dieringer, Schlotterer, 2003) с трансформацией $1-Dps$. Дерево по методу ближайшего соседства построено на основе матрицы в программе *PhyIip* (Plotree, Plotgram, 1989). Для построения дистанционных деревьев на уровне популяций вычисления осуществлялись в программе *MSA 4.05* (Dieringer, Schlotterer, 2003) с использованием расстояния *Dps* (Bowcock et al., 1994), а также расстояния Нея *Da* (Nei et al., 1983). Дендрограммы были построены с помощью программы *Consense* пакета *PhyIip* (Plotree, Plotgram, 1989) и визуализированы в программе *Figtree 1.4* (Rambaut, 2009).

Анализ в программе STRUCTURE.

Для оценки популяционной структуры сахалинского тайменя на основе мультилокусных генотипов использовалась программа *STRUCTURE 2.3.4*. (Pritchard et al., 2000), тестировались величины K (вероятное число популяций) от 1 до 30 для полного набора данных. Для каждого числа K анализ повторялся 10 раз с целью сбора необходимой статистики по значениям и средней дисперсии логарифма значения функции правдоподобия. Тестирование числа возможных популяций производилось с помощью 450 000 генераций Марковских Цепей Монте-Карло, с отбрасыванием (*burn-in*) первых 250 000 генераций. Для визуализации и постобработки файлов *STRUCTURE* использовались программы *CLUMPP 1.1.1* (Jakobsson, Rosenberg, 2007) и *Distruct 1.1* (Rosenberg, 2004).

Изоляция расстоянием.

Тестирование производилось в программе *GenAlex 6.5* (Peakall, Smouse, 2012), уровень статистической значимости корреляции определялся с помощью 10000 пермутаций. Были сформированы две матрицы на основе попарных генетических дистанций Нея *Da* (Nei et al., 1983) с трансформацией $Da/(1-Da)$ и попарных географических расстояний. Пространственный анализ автокорреляции: *Spatial Autocorrelation Analysis* (Smouse, Peakall, 1999) использовался с интервалом в 50 км и тестированием с помощью 5000 бутстреп-репликаций.

Анализ полиморфизма фрагментов митохондриальной ДНК.

Статистики уровня полиморфизма фрагментов митохондриальной ДНК тайменя были рассчитаны в программе *DNASP 5.10.1* (Rozas et al., 2003) и *GenAlex 6.5* (Peakall,

Smouse, 2012). Генеалогическая сеть гаплотипов была построена с использованием метода *median-joining* (Bandelt et al., 1999) в программе *Network* (Forster et al., 2004), и визуализирована с помощью программы *Haplotype Viewer* (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>). Филогенетический анализ выполнялся в программе *MrBayes 3* (Ronquist, Huelsenbeck 2003) в ходе 10 миллионов генераций марковских цепей методом Монте-Карло (модель *HKY*). Конвергенция всех параметров проверялась в программе *Tracer 1.5* (Rambaut, Drummond, 2005), результаты первых двух миллионов итераций были отброшены (*burn-in*).

Анализ дисперсии молекулярного разнообразия (AMOVA).

Анализ проводился в программе *Arlequin 3.5* (Excoffier et al., 2005) с тестированием по 1000 пермутаций.

Генетическое разнообразие и эффективная численность популяций.

Анализ усредненного по всем локусам аллельного разнообразия популяций сахалинского тайменя проводился в программе *MSA 4.05* (Dieringer, Schlötterer, 2003), и тестировался по 200 пермутациям на выборке из 5 рыб с помощью метода *rarefaction*. В связи с сильно варьирующим числом особей в выборках и их малым в среднем числом, для оценки ожидаемой гетерозиготности (H_e) была использована ее несмещенная оценка (uH_e ; Nei, 1978).

Эффективная численность популяций сахалинского тайменя оценивалась в программе *NeEstimator V.2* (Do et al., 2014), с использованием метода неравновесия по сцеплению (Waples, 2006), тестирование и получение доверительных интервалов проводилось с помощью бутстрепа и методики *jackknife*, расчет минимальной частоты используемых аллелей (P_{crit}): $1/2 S$, где S – размер выборки, как было предложено авторами метода (Waples, Do, 2010).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отклонения от равновесия Харди-Вайнберга и популяционно-генетическая дифференциация выборок.

Статистически значимого избытка гетерозигот в изученных выборках сахалинского тайменя не обнаружено. В семи выборках из пяти популяций обнаружен недостаток гетерозигот, что могло быть вызвано как инбридингом, так и смешением разных субпопуляций в одной выборке.

Популяции сахалинского тайменя демонстрируют высокую степень генетической дифференциации (Рисунок 2). Подавляющее число попарных сравнений (768 из 820) демонстрируют значительную генетическую дифференциацию: среднее значение величин θ (оценок F_{st} -статистики) равно 0,12, их доверительные интервалы не перекрываются со значением 0, что является индикатором высокой статистической значимости. Из 52 попарных сравнений, 95%-ый интервал которых перекрывается с нулем, 9 относятся к выборкам из одних и тех же водоемов, а остальные демонстрируют крайне низкие средние значения дифференциации.

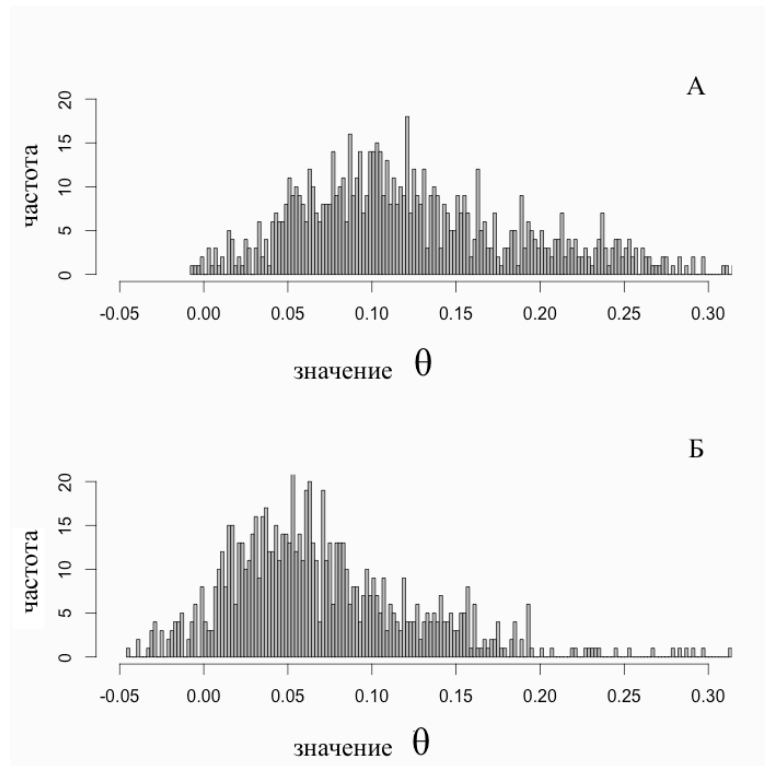


Рисунок 2. Гистограммы распределений попарных значений θ для всех выборок: А) средние значения по результатам бутстреп-теста Б) минимальные значения по результатам бутстреп-теста.

Кластеризация особей на основе попарных индивидуальных расстояний и методом анализа в пространстве главных компонент

По результатам кластеризации мультилокусных генотипов особей методом ближайшего соседства на основе матрицы расстояний *Dps* (Рисунок 3) отчетливо выделяются в отдельные группы генотипы из бассейна реки Поронай, с юга Хабаровского и Приморского краев. Сходная картина наблюдается и при анализе в пространстве главных компонент. Выборки с материковой части, бассейна реки Поронай, Восточного Сахалина, Южного Сахалина, островов Хоккайдо, Кунашира и двух водоемов Итурупа формируют хорошо различимые кластеры индивидов. В то же время, следует отметить, что выборки с Западного Сахалина не образуют единого кластера; кроме того, немало особей отнесены к «неродным» группам водоемов.

Кластеризация выборок в пространстве главных компонент и на основе попарных генетических расстояний

По результатам популяционно-генетического анализа на основе дистанций между популяционными выборками формируются отдельные группы на дереве расстояний с высокими значениями бутстреп-поддержки для материковой клады, бассейна реки Поронай, острова Итуруп (Рисунок 4). Популяции юга Сахалина, Северо-Востока и Северо-Запада формируют также отдельные клады, но с меньшей поддержкой. Материковые популяции формируют клинальное построение с северными популяциями ближе к корню дерева и южными ближе к концевым ветвям. По результатам анализа популяционных выборок в пространстве главных компонент, вновь обособляются группы популяций бассейна реки Поронай, острова Итуруп, материковой части ареала. Группы

популяций сахалинского тайменя материкового побережья, бассейна реки Поронай, северо-востока Сахалина, северо-запада Сахалина и острова Итуруп демонстрируют сходство в частотах общих аллелей внутри групп. Группируемость демонстрируется не только на уровне популяций, но и на уровне отдельных особей. Наибольшую дивергенцию проявляют популяции бассейна реки Поронай, материковой части ареала и острова Итуруп.

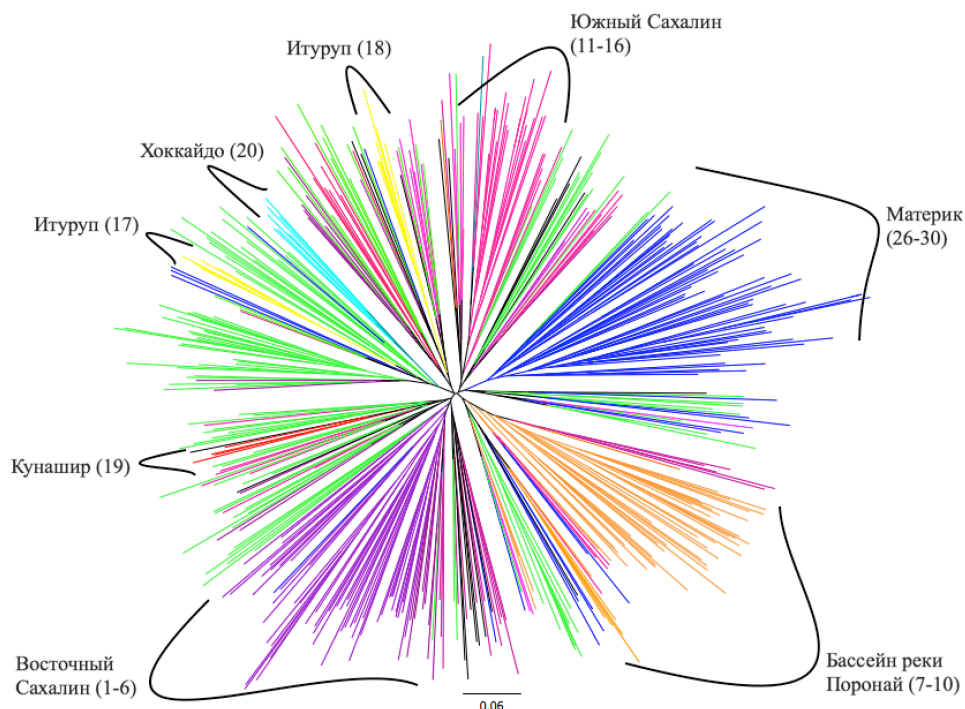


Рисунок 3. Неукоренённое дерево (*NJ*) на основе расстояний *Dps* (пропорция одинаковых аллелей). Зеленый цвет - выборки с западного Сахалина (водоемы №21-25).

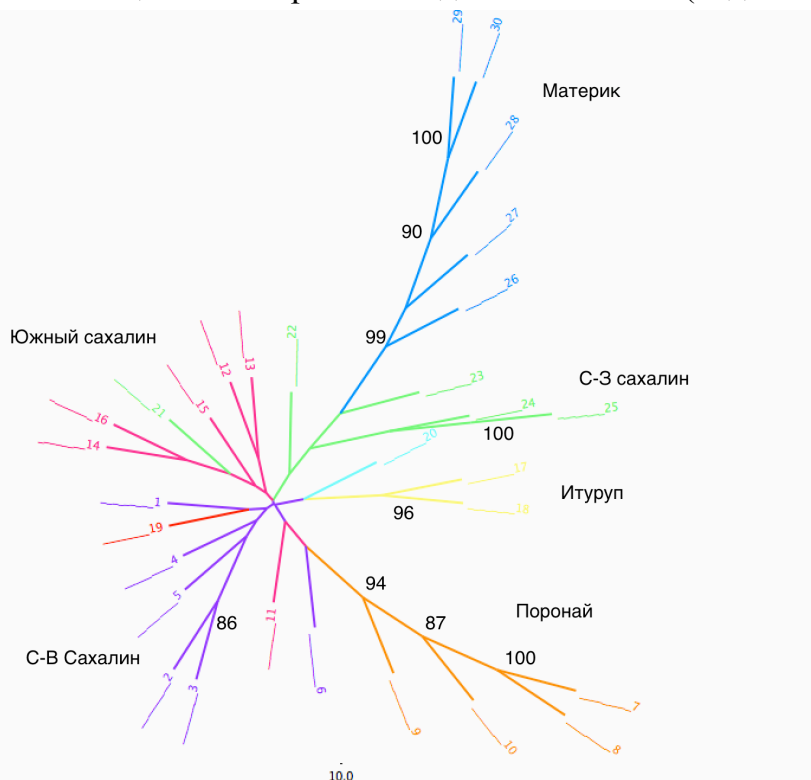


Рисунок 4. Популяционная дендрограмма, (*NJ*) на основе расстояний Нея *Da*. Указаны номера водоемов, в узлах ветвления процент бутстреп-репликаций, поддерживающих данную топологию (для > 60%).

Выявление иерархической популяционной структуры с использованием алгоритма программы *STRUCTURE*

Средние значения логарифма функции правдоподобия при оптимизации модели в программе *STRUCTURE* демонстрировали быстрый рост до достижения значения $K=6$, затем рост замедлялся, а стандартные отклонения каждой из 10 репликаций с одним и тем же значением числа предковых популяций (K) начинали возрастать. Из этого можно заключить, что наиболее вероятное число возможных популяций высшей иерархии находится в районе 5-11. Число выявленных популяционных кластеров, к которым относится большинство особей, постепенно увеличивается от $K=2$ до $K=12$. Начиная с $K=12$, добавочные кластеры поглощают крайне незначительную долю генетической изменчивости, а большинство особей по-прежнему относится к 12-ти популяционным кластерам (Рисунок 5). При простейшей модели ($K=2$) группы популяций подразделяются на две основных части: сахалинские (северо-восток и юг острова), курильские, японские с одной стороны и материковые, северо-запада Сахалина, а также бассейна реки Поронай – с другой. При использовании иерархического подхода к алгоритму программы *STRUCTURE* (определение оптимального числа популяций по методу Evanno et al, 2005, а затем повторение анализа для каждого кластера в отдельности) высшая популяционная иерархия в значительной степени совпадает с выявленной другими методами – кластеризацией на основе меры D_{ps} и анализом главных компонент.

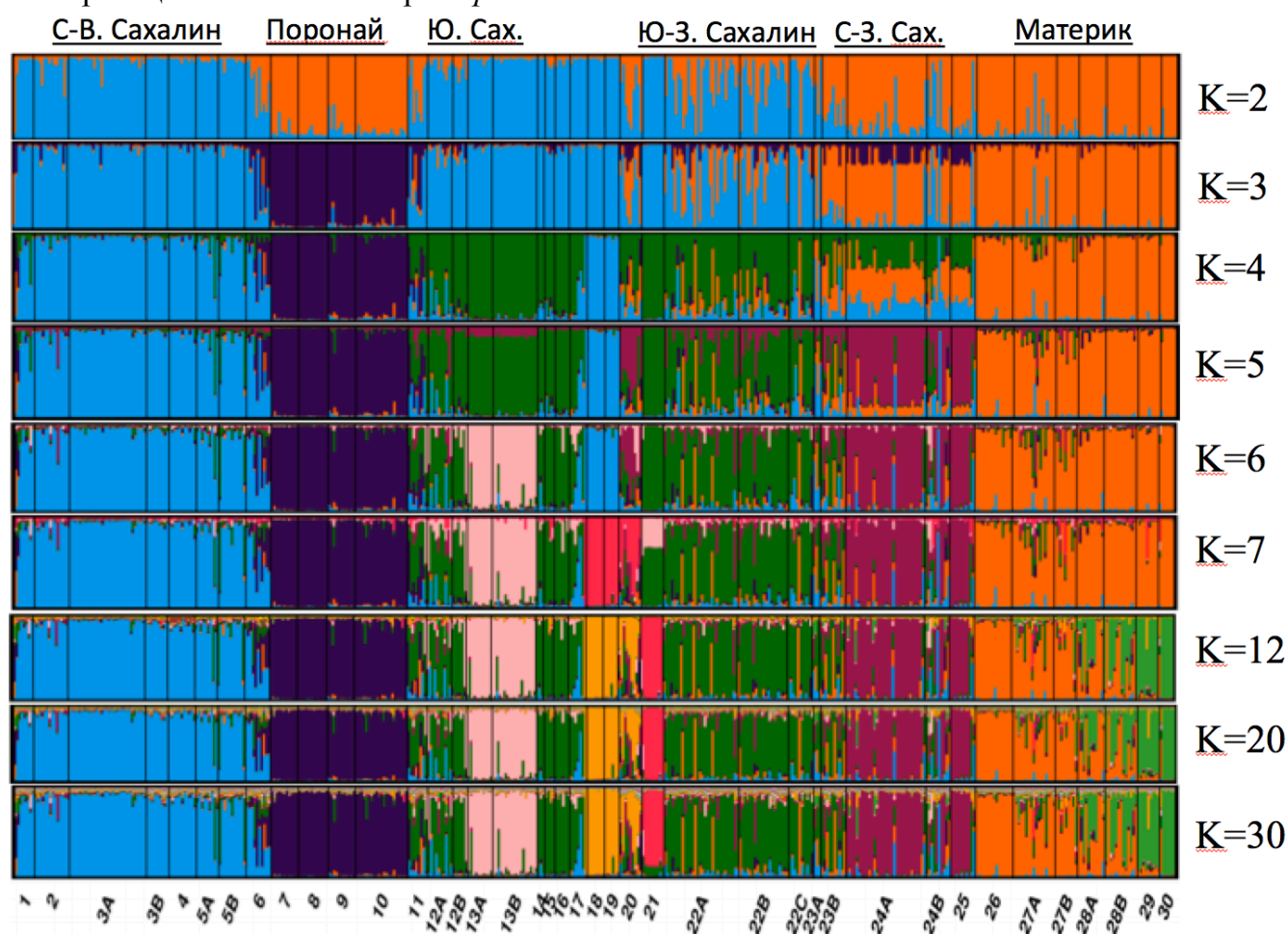


Рисунок 5. Апостериорные вероятности принадлежности особей сахалинского тайменя к выявленным популяционным кластерам для различного числа возможных разбиений (K). Номера выборок указаны в соответствии с обозначениями на Рисунке 1.

Изоляция расстоянием

Тест Мантеля на эффект изоляции расстоянием демонстрирует достаточно высокую ($R^2=0,26$ для всех выборок) и статистически значимую ($p=0,01$) корреляцию между географическими и генетическими расстояниями для исследованных популяций сахалинского тайменя (Рисунок 6).

По результатам автокорреляционного анализа наиболее достоверная корреляция между генетическими и географическими расстояниями обнаруживается на дистанции до 200 км, то есть между соседними популяциями. Этот результат говорит в пользу гипотезы о том, что именно миграции, а не филогеографические процессы сформировали наблюдаемые паттерны популяционной дифференциации, потому что в противном случае ожидалась бы устойчивая корреляция лишь на дальних расстояниях (как между отдельными островами, так и между островами и материком).

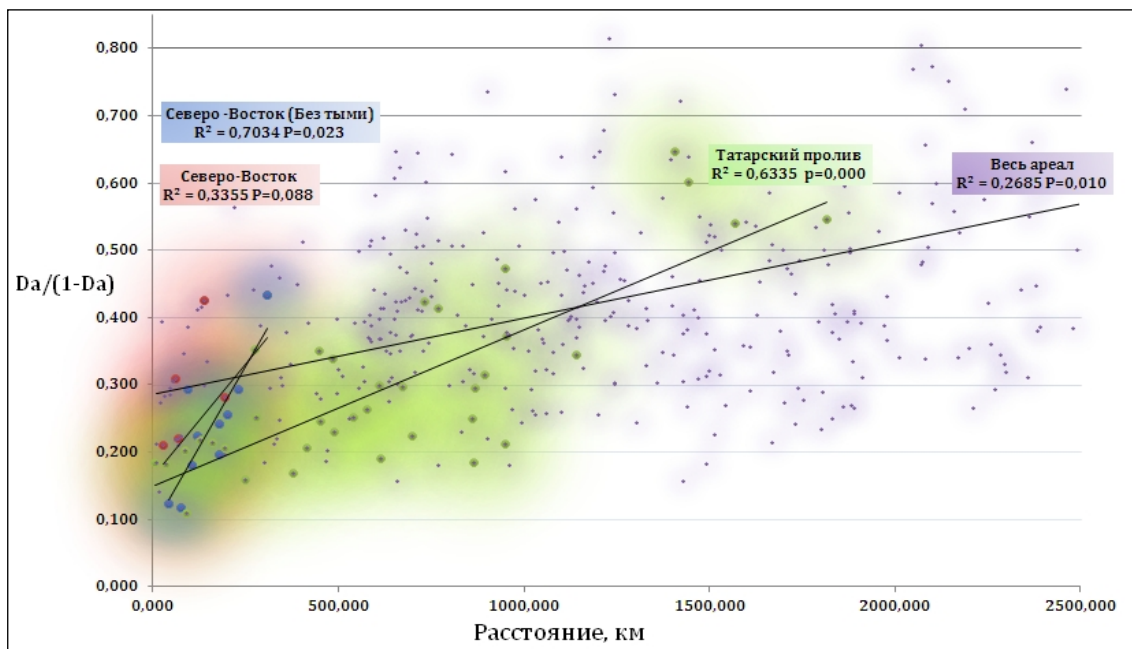


Рисунок 6. Результаты теста Мантеля на изоляцию расстоянием между популяциями сахалинского тайменя для всех выборок сразу, а также подвыборок для отдельных географических районов (p – уровни статистической значимости).

Микросателлитное генетическое разнообразие и оценка эффективной численности популяций сахалинского тайменя

Усредненные по всем локусам значения ожидаемой гетерозиготности для изученных популяций на ареале сахалинского тайменя варьируют в пределах от 0,306 до 0,601 при среднем значении 0,514 (Рисунок 7). Наиболее низкие значения средней ожидаемой гетерозиготности наблюдаются у выборок острова Итуруп (№ 17-18) и оз. Тайное (№21). Наибольшее разнообразие демонстрируют популяции юга Хабаровского края, населяющие крупные реки, впадающие в Татарский пролив – Тумнин и Коппи (№27,28), а также популяция озера Айнское (№22). Обедненным разнообразием обладают популяции острова Итуруп (№17,18), а также озера Тайное (№21), представляющего собой водохранилище, образованное на небольшой реке в 1920-х годах. Аллельное разнообразие остальных популяций также варьирует, но остается сравнимым между собой. Для

большинства исследованных популяций, эффективная численность не превышает 50 особей (Таблица 1). Лишь для пяти популяций из крупных водоемов Сахалина (реки Даги, Вал, озеро Айнское) и Хабаровского края (реки Тумнин и Коппи) минимальная эффективная численность колеблется на уровне 78-230 особей, что также невелико, учитывая масштабы и уникальность этих водоемов на ареале вида.

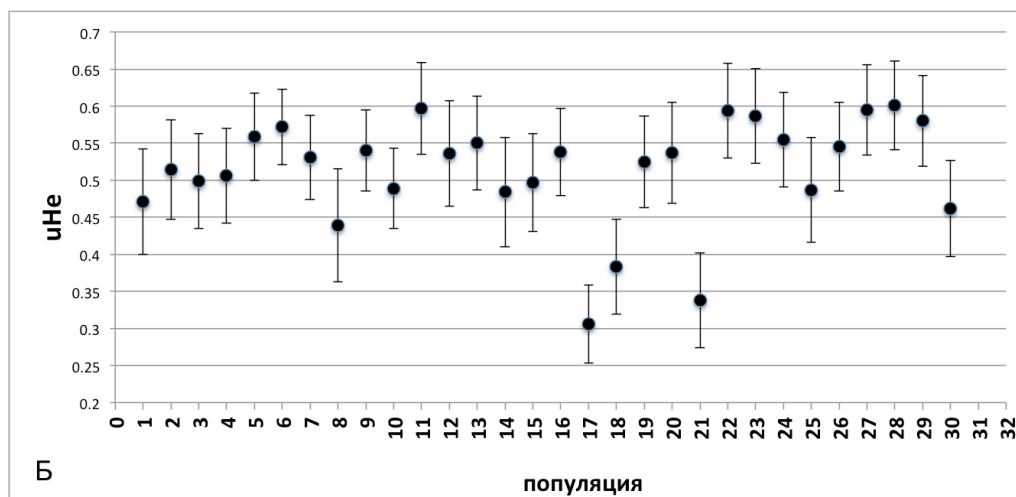


Рисунок 7. Несмещенная оценка ожидаемой гетерозиготности \pm стандартная ошибка.

Таблица 1. Оценка эффективной численности популяций сахалинского тайменя методом неравновесия по сцеплению.

Популяция	Размер выборки	R_{crit}	r^2	$Exp(r^2)$	Средняя оценка N_e	Минимальная оценка N_e (бутстреп)	Максимальная оценка N_e (бутстреп)	Минимальная оценка N_e (jackknife)	Максимальная оценка N_e (jackknife)
1	8	0,07	0,205	0,210	н.д.	18,8	н.д.	31,4	н.д.
2	14	0,03	0,095	0,089	50,1	23,6	913,6	26,9	203
3	40	0,01	0,030	0,028	183,2	105	585,6	78,5	н.д.
4	11	0,05	0,152	0,127	10,4	5,4	23	4,9	26,5
5	20	0,02	0,059	0,059	н.д.	117,6	н.д.	100,6	н.д.
6	10	0,05	0,147	0,138	30,2	12,7	н.д.	16,5	101,7
7	11	0,05	0,138	0,132	49,9	15,9	н.д.	20,3	н.д.
8	12	0,05	0,167	0,108	2,6	2	4,7	2	3,9
9	21	0,02	0,068	0,056	23,1	16,6	35,1	17,1	33,4
10	11	0,05	0,159	0,140	14,7	6,5	70,6	7,1	51,7
11	8	0,05	0,200	0,205	н.д.	32,4	н.д.	60,9	н.д.
12	16	0,05	0,083	0,081	139,3	36,5	н.д.	39,5	н.д.
13	28	0,02	0,054	0,042	24	18,8	31,9	18,7	32
14	3	0,05	0,679	0,797	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
15	11	0,05	0,179	0,155	10,7	4,9	30,9	5,3	26,5
16	6	0,08	0,276	0,276	н.д.	8,9	н.д.	18,5	н.д.
17	7	0,08	0,305	0,228	2	0,9	26,7	0,9	20,3
18	7	0,08	0,229	0,233	н.д.	4,1	н.д.	6	н.д.
19	6	0,08	0,295	0,279	17,6	3,3	н.д.	6,5	н.д.

Популяция	Размер выборки	P_{crit}	r^2	$Exp(r^2)$	Средняя оценка N_e	Минимальная оценка N_e (бутстреп)	Максимальная оценка N_e (бутстреп)	Минимальная оценка N_e (jackknife)	Максимальная оценка N_e (jackknife)
20	9	0,08	0,172	0,165	44,4	11,2	н.д.	12,5	н.д.
21	9	0,08	0,202	0,157	3,8	2	15,1	1,9	17,9
22	60	0	0,019	0,018	361,4	223,6	873,1	173,2	95441,6
23	13	0,05	0,111	0,113	н.д.	45,4	н.д.	39,7	н.д.
24	42	0,01	0,034	0,028	51,9	42,2	65,9	40,7	69,3
25	10	0,05	0,144	0,137	43,2	15,2	н.д.	18,7	н.д.
26	15	0,03	0,096	0,085	25,1	16,1	47,8	16,7	44
27	26	0,02	0,044	0,044	639,9	128,4	н.д.	126,5	н.д.
28	24	0,02	0,050	0,050	н.д.	231,1	н.д.	195,2	н.д.
29	9	0,1	0,161	0,163	н.д.	18,8	н.д.	25,2	н.д.
30	6	0,1	0,435	0,306	1,2	0,8	2,1	0,9	1,6

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA)

По результатам анализа молекулярной дисперсии (AMOVA), разделение на контрастирующие типы популяционной иерархии статистически значимо (Таблица 2), как с предположением об уникальности всех популяций (1), так и с разбиением популяций по иерархическому признаку (2-4). Доля межгрупповой компоненты варьирует от 9.59% до 17.48% для разных разбиений. Наибольшая межгрупповая компонента проявляется при разбиении групп популяций по простому географическому признаку – каждый остров в отдельности и материк. Почти при всех типах разбиения на группы доля межгрупповой изменчивости в 1,5-2 раза превосходит уровень внутригрупповой межпопуляционной изменчивости, являясь статистически значимой, что подтверждает иерархическое устройство популяционно-генетической структуры сахалинского тайменя.

Таблица 2. Результаты анализа молекулярной дисперсии AMOVA для различных разбиений на группы популяций.

Тип анализа	% изменчивости между группами	% изменчивости между популяциями внутри групп	% изменчивости между особями в пределах популяций	% изменчивости в пределах особей	FIS	FSC	FCT	FIT
1. Все популяции в одной группе, без иерархической подразделенности	16.94 (между популяциями)	-	4.37	78.69	0.052	0.169	-	0.213
2. Подразделение по географическому признаку (Сахалин, материк, Итуруп, Кунашир, Хоккайдо)	17.48	8.18	3.91	70.43	0.052	0.099	0.174	0.296

Тип анализа	% изменчивости между группами	% изменчивости между популяциями внутри групп	% изменчивости между особями в пределах популяций	% изменчивости в пределах особей	FIS	FSC	FCT	FIT
3. Разделение на основе результатов <i>STRUCTURE</i> (северо-восточный Сахалин, бассейн реки Поронай, Южный Сахалин, Северо-Западный Сахалин, Материк)	9,59	8,84	4,29	77,28	0.052	0.097	0.095	0.227
4. Разделение по географическому признаку с выделением групп внутри острова Сахалин на основе меры <i>Dps</i> (бассейн реки Поронай, северо-восточный Сахалин, северо-западный Сахалин)	10,24	8	4,3	77,46	0.052	0.089	0.102	0.225
4. Разделение на основе зоогеографических регионов (по Мартыненко, 2007).	12,12	6,1	4,3	77,48	0.052	0.069	0.121	0.225

Филогенетический анализ фрагментов митохондриальной ДНК сахалинского тайменя

Секвенированные фрагменты двух митохондриальных генов были сконкатенированы в один фрагмент длиной 1029 пар нуклеотидов. Всего было обнаружено 22 полиморфных сайта (5 из них вызваны несинонимичными заменами) в исследованных фрагментах и 14 гаплотипов. Среднее гаплотипическое разнообразие (Hd) составило $0,833 \pm 0,023$ для объединенной выборки, а нуклеотидное разнообразие (Pi) $0,0039 \pm 0,00024$. Рассмотрение филогеографической структуры проводилось на основе экорегональных групп, выделенных для Дальнего Востока (Мартыненко, 2007). Зоогеографические группы сахалинского тайменя демонстрируют близкий к среднему уровень гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, за исключением выборок Курильских островов (средние значения Hd $0-0.286 \pm 0,196$) и единственной выборки с острова Хоккайдо ($Hd=0,5 \pm 0,256$), показывающих пониженный уровень гаплотипического разнообразия. Построенная генеалогическая сеть гаплотипов позволяет выделить 4 крупных гаплогруппы (Рисунок 8). Гаплотипы, по большей части, не демонстрируют монофилетической обособленности для отдельных географических регионов за исключением некоторых выборок: о. Хоккайдо, о. Итуруп (Рисунок 9). Большая часть гаплотипов представлена на всем ареале сахалинского тайменя.

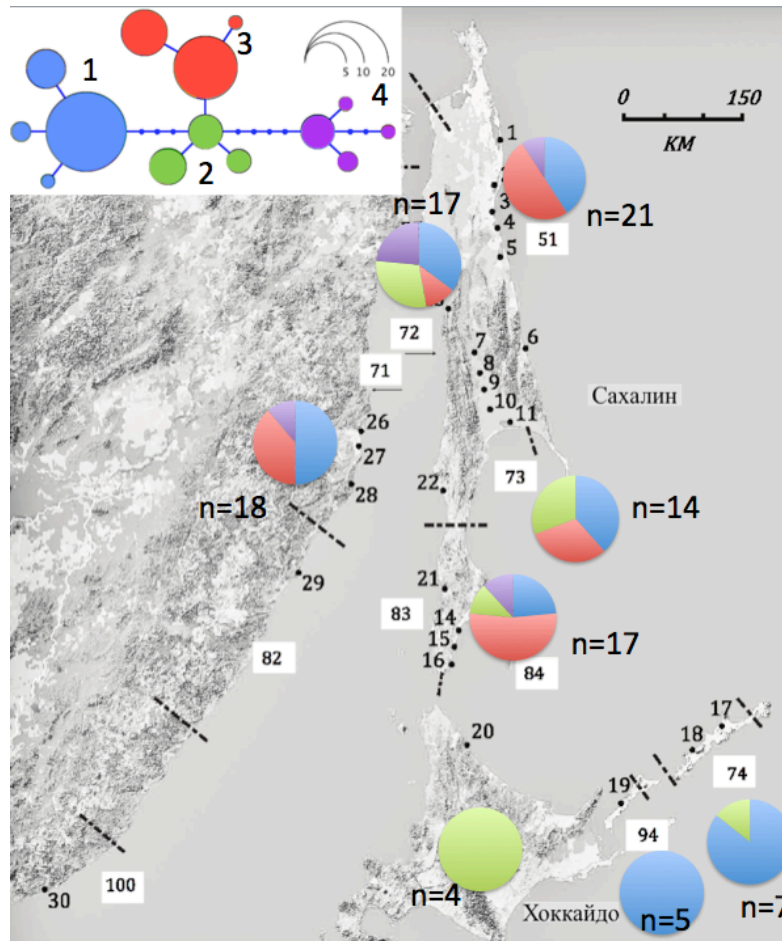


Рисунок 8. Распределение основных гаплогрупп (1-4) в крупных зоогеографических регионах обитания сахалинского тайменя (показаны в белых квадратах).

При анализе более крупных географических регионов (каждый из островов отдельно и материковая часть), наблюдается схожая картина распределения гаплотипов (Рисунок 8), но материковые популяции преимущественно представлены часто встречающимися гаплотипами, в то время как сахалинские обогащены достаточно редкими вариантами.

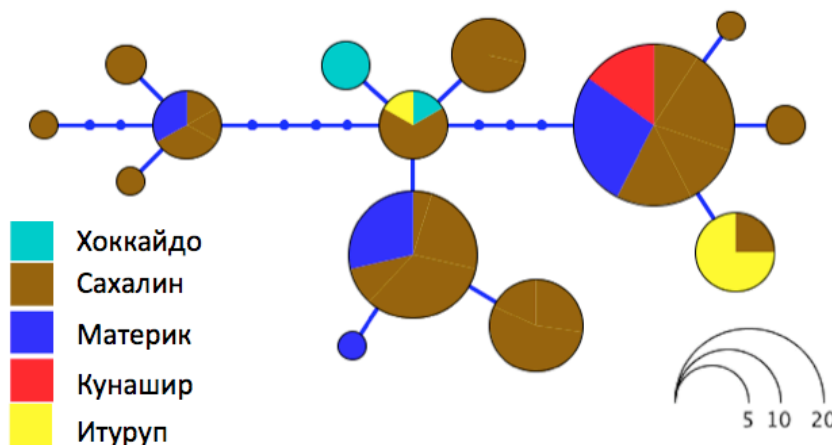


Рисунок 9. Генеалогическая сеть гаплотипов для изученных фрагментов митохондриальной ДНК сахалинского тайменя. Различными цветами обозначены наиболее крупные географические регионы на ареале вида. Показан масштаб и число нуклеотидных замен между гаплотипами.

Основные гаплогруппы распространены по сахалинским и материковым популяциям (Рисунок 9). Одна из наиболее дивергированных гаплогрупп (№4) отсутствует в бассейне реки Поронай, а также на Хоккайдо и Курильских островах. Центральная гаплогруппа (№2) не представлена в материковых выборках и на северо-востоке Сахалина, но достигает высокой частоты в бассейне реки Поронай. Выявленные другими методами группы близкорасположенных популяций не обнаруживают значительной нуклеотидной дивергенции при использовании фрагментов митохондриальной ДНК. Отсутствуют монофилетические клады, ассоциированные с какой-либо отдельной популяцией или группой популяций, за исключением выборок с острова Итуруп.

ОБСУЖДЕНИЕ

Популяционно-генетическая дифференциация популяций сахалинского тайменя

Полученные в ходе настоящего исследования результаты указывают на наличие ярко выраженной иерархической структуры популяций сахалинского тайменя с высокими уровнями генетической дифференциации, что подтверждается большими значениями параметра θ (оценки F_{st} -статистики) между большинством исследованных популяций (Рисунок 2). Среднее значение θ между парами популяций составило 0,12, при размахе от -0,02 до 0,34. Для сравнения укажем уровни межпопуляционной дифференциации для других лососевых видов из исследованного региона: 0,20 для кунджи *Salvelinus leucomaenis* (Salmenkova et al., 2014, без камчатских и магаданских выборок), 0,088 для кеты *Oncorhynchus keta* (Afanas'ev et al., 2011) и 0,058 для симы *Oncorhynchus masou* (Yu et al., 2010). Отсутствие значительных отклонений от равновесия Харди-Вайнберга для большинства популяций сахалинского тайменя, вместе с данными по их генетической дифференциации подтверждает, что локальные популяции сахалинского тайменя представлены на уровне максимум отдельных водоемов.

Иерархическая структура популяций сахалинского тайменя на ареале вида

С использованием различных методов кластеризации популяций показано, что отдельные близкорасположенные популяции сахалинского тайменя группируются в четко выделенные группы, создавая второй, более высокий уровень популяционно-генетической иерархии после локальных популяций. Наличие групп популяций подтверждается анализом мультилокусных генотипов в пространстве главных компонент, популяционными дендрограммами на основе матриц генетических расстояний, анализом в программе *STRUCTURE*. Не все методы кластеризации дают одни и те же результаты (Рисунок 11), но уверенно выделяются следующие популяционные группы: северо-восточный Сахалин, бассейн реки Поронай, остров Итуруп, северо-западный Сахалин, материковая часть ареала вида. Достаточно дивергированными предстают и популяции острова Хоккайдо и острова Кунашир. Популяции юга острова Сахалин кластеризуются лишь по результатам программы *STRUCTURE*, причем совместно с озером Айнское на юге западной части Сахалина (Рисунок 5, $K=4-30$).

По результатам анализа молекулярной дисперсии (*AMOVA*), уровень межгрупповой популяционной дифференциации выделенных группировок в 1,5-2 раза превосходит внутригрупповой (Таблица 2). Эти оценки являются очень усредненными, так как территория обитания сахалинского тайменя представляет собой ряд островов и материковое побережье с различным уровнем изоляции этих географических компонент друг от друга, но позволяют сделать вывод о наличии ярко выраженной иерархической популяционной структуры сахалинского тайменя, состоящей из локальных популяций на уровне отдельных водоёмов и групп популяций на уровне крупных географических регионов.

Зоогеографические регионы Дальнего Востока и группы популяций сахалинского тайменя

Сахалинский таймень обитает в очень гетерогенных природных условиях Дальнего Востока России. По данным провизорного зоогеографического районирования для российского Дальнего Востока (Мартыненко, 2007), российская часть современного ареала обитания сахалинского тайменя разбивается на 11 таких районов (Рисунок 1).

С использованием 4 методов кластеризации, для групп популяций острова Сахалин наблюдается соответствие между зоогеографическим районированием по Мартыненко и кластеризацией с использованием различных популяционно-генетических алгоритмов (Рисунок 11). Именно, группа популяций региона #51 (северо-восточный Сахалин) поддерживается тремя методами, отчетливо выделяется регион #73 (бассейн реки Поронай), двумя методами поддерживается западный Сахалин (регион #72 за исключением озера Айнского), популяции острова Итуруп (#74). Этот же паттерн наблюдается даже для индивидуальных мультилокусных генотипов из обсуждаемых регионов (Рисунок 3). Попарные генетические расстояния Нея *Da* (Nei, 1983) между популяциями внутри зоогеографических регионов, в среднем, значительно меньше, чем между ними (Рисунок 10).

Формирование генетической структуры популяций сахалинского тайменя

В настоящей работе, с использованием 2 фрагментов генов митохондриальной ДНК показано, что несмотря на наличие генетически различающихся групп популяций, выделенных на основе микросателлитных локусов ДНК, на ареале сахалинского тайменя отсутствуют глубоко дивергированные митохондриальные клады приуроченные к определенным территориям, наблюдаемые для многих других видов с выраженной популяционно-генетической структурой. Наличие таких клад могло бы свидетельствовать в пользу длительной изолированной эволюционной истории определенных групп популяций, но преобладание уникальных гаплотипов наблюдается лишь для исследованных популяций острова Итуруп и единственной выборки с острова Хоккайдо, что может свидетельствовать о длительной изоляции этих популяций в условиях низкой численности, что подтверждается и микросателлитными данными. Важно отметить, что данные гаплотипы отличаются лишь на одну замену от более распространенных на ареале (Рисунок 8, 9).

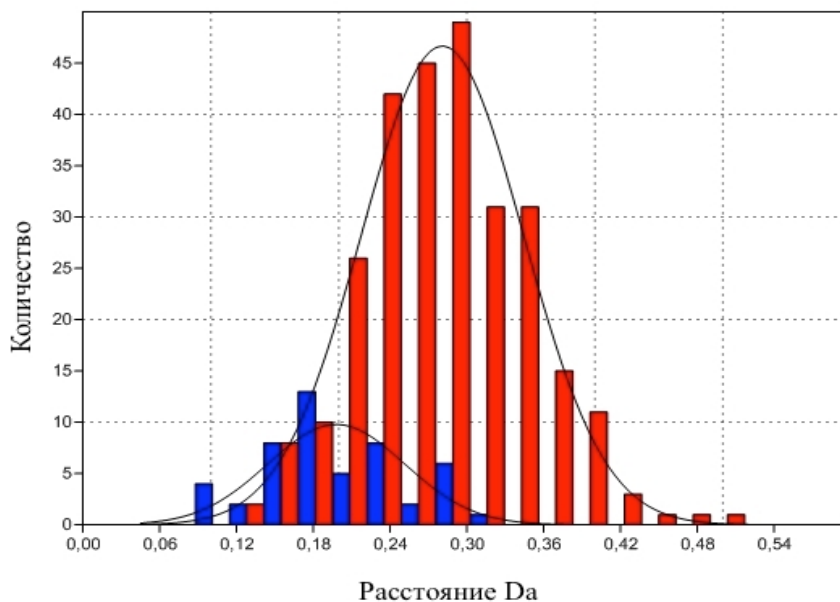


Рисунок 10. Распределение генетических расстояний Нея Da между парами популяций внутри (синий цвет) и вне зоогеографических регионов (красный цвет).

Показательна и совместная кластеризация значительно дивергированных групп островов Итуруп, Кунашир и Хоккайдо совместно с сахалинскими выборками по результатам микросателлитного анализа (Рисунок 5). Вероятно, этот паттерн отражает прошлую связь Сахалина с Курилами и Японскими островами в период последнего оледенения, когда уровень моря значительно опускался, образуя лагуноподобный залив на месте современного Японского моря, окаймленный с востока группой соединенных островов, включающих острова Японского архипелага, Сахалин и Южные Курильские острова (Величко, 2009). В целом, глубокой дивергенции по исследованным фрагментам мтДНК для групп и популяций сахалинского тайменя не наблюдается. Отсутствие монофилетических клад, приуроченных к каким-либо географическим территориям может объясняться разными причинами:

- 1) недостаточность информации в исследуемых митохондриальных фрагментах ДНК для выявления филогеографической истории вида;
- 2) регулярные миграции сильно гомогенизируют общий паттерн изменчивости, что вместе с невысоким гаплотипическим разнообразием (всего 14 гаплотипов) нивелирует действие генетического дрейфа в отдельных популяциях;
- 3) относительно быстрое расселение сахалинского тайменя из рефугиумов, «перемешавшее» гаплотипы более или менее случайным образом.

Генетическое разнообразие популяций сахалинского тайменя и избежание негативных последствий искусственного разведения вида

В результате настоящей работы показано, что уровень внутривидового генетического разнообразия сахалинского тайменя не варьирует сильно на ареале вида как по микросателлитным маркерам ДНК (Рисунок 7), так и фрагментам митохондриальной ДНК. Заметно выделяется своим обедненным генетическим разнообразием по обоим

маркерам лишь группа популяций острова Итуруп, что вероятно вызвано как сильной изоляцией острова, так и антропогенным воздействием

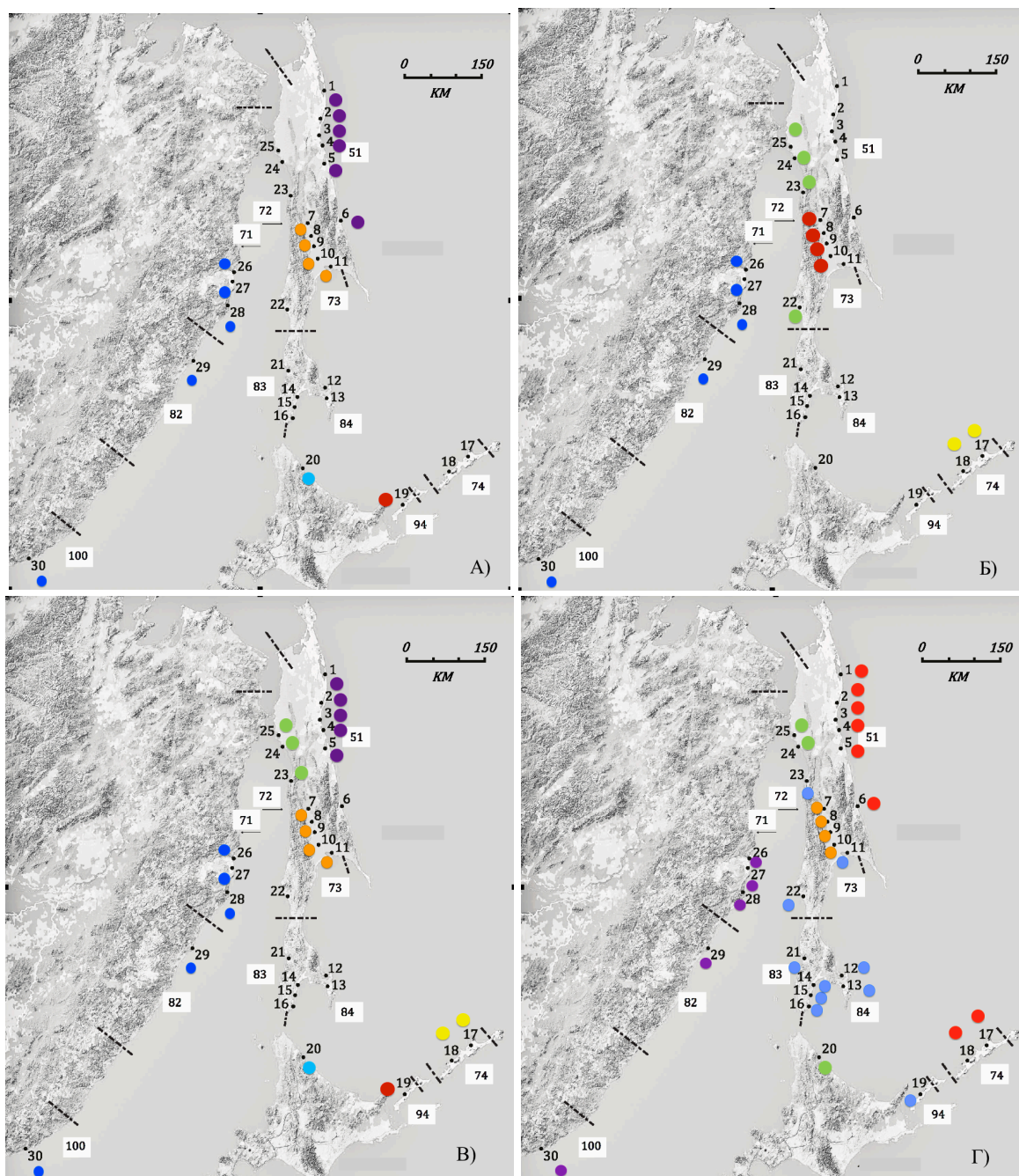


Рисунок 11. Группы популяций сахалинского тайменя и схема провизорного зоогеографического районирования Дальнего Востока (по Мартыненко, 2007). Цифры в белых квадратах – номера зоогеографических районов, пунктирная линия – границы районов по морскому побережью. Выделение групп популяций проведено на основе:

- (А) индивидуальных *Dps* – расстояний (см. Рисунок 3);
- (Б) анализа популяционных выборок в пространстве главных компонент;
- (В) популяционных *Dps* – расстояний;
- (Г) иерархической кластеризации в программе *STRUCTURE* (см. Рисунок 5).

Популяции, которые выделяются в определенные группы с высокой долей уверенности, обозначены одним цветом.

Относительно низким гаплотипическим разнообразием обладают выборки с материковой части ареала ($Hd=0,66\pm 0,078$), являясь при этом наиболее разнообразными по микросателлитным маркерам ДНК. Известно, что северные материковые популяции являются одними из наиболее многочисленных на ареале сахалинского тайменя и поддерживаются крупными водоемами, такими как реки Тумнин, Коппи, Самарга.

При искусственном разведении всегда возникает риск возникновения негативных последствий аутбридинга, приводящих к эрозии популяционных генофондов. Согласно анализу вероятности развития аутбредной депрессии (Frankham et al., 2011), для уровня зоогеографических регионов ответ получается однозначным - высокая вероятность возникновения аутбредной депрессии при перемещении особей между зоогеографическими регионами. Для популяций внутри зоогеографических регионов возможны поддерживающие реинтродукции для восстановления генетического разнообразия популяций, что особенно актуально для популяций с низким уровнем генетического разнообразия (как, например, популяции острова Итуруп).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящей работы были собраны уникальные выборки, охватывающие большую часть ареала сахалинского тайменя *Parahucho perryi*. На основе разработанной панели из 19 микросателлитных локусов ДНК было генотипировано 473 особи сахалинского тайменя. Секвенированы два участка митохондриальной ДНК (часть гена цитохромоксидазы-1 (*COI*) и цитохрома *b* (*CytB*), длиной 600 п.н. и 429 п.н. соответственно) у 103 особей.

В ходе работы показано, что генетическая структура сахалинского тайменя формируется высоко дифференцированными локальными популяциями на уровне отдельных водоемов с возможной микрогеографической дифференциацией на уровне отдельных нерестовых ручьев и притоков рек и озер. Несмотря на высокий уровень дифференциации между популяциями, они группируются на уровне отдельных географических экорегионов (северо-восточный Сахалин, бассейн реки Поронай, о. Итуруп, северо-западный Сахалин, материковая часть ареала вида) и возможно связаны миграциями внутри них. Гипотеза о длительной изоляции зоогеографических групп популяций не подтверждается филогеографическими данными.

Методом неравновесия по сцеплению оценена эффективная численность популяций сахалинского тайменя, показана критически низкая минимальная численность для большинства популяций, что отражает особенности биологии вида и, вероятно, последствия антропогенного воздействия в ходе последних десятилетий. В то же время, уровень генетического разнообразия сахалинского тайменя остается схожим для большинства популяций, что говорит в пользу версии об антропогенных причинах снижения численности, так как гетерозиготность скорее отражает эффективную численность популяций на больших исторических отрезках времени и быстро снижается лишь в очень маленьких популяциях (в настоящей работе это обнаружено для водоемов острова Итуруп и озера Тайное на юго-западе Сахалина).

На основе данных по выявленным особенностям популяционно-генетической дифференциации вида даны рекомендации по минимизации аутбредной и инбредной

депрессий в популяциях сахалинского тайменя при искусственном разведении вида. Производители, в случае отсутствия их в водоеме, куда предполагается производить выпуск мальков, должны быть взяты только из соседних водоемов с сохранением их специфики (река – озеро) во избежание аутбредной депрессии. Необходим регулярный генетический мониторинг популяций сахалинского тайменя, в том числе малых, искусственное разведение исчезающих популяций, охрана и восстановление мест обитания и воспроизводства сахалинского тайменя.

Перспективы дальнейшей разработки темы

1) Изучение геномных механизмов естественного отбора и локальных адаптаций вида в условиях активного генетического дрейфа. Тема является важной и становится осуществимой практически в последние годы с появлением технологий секвенирования нового поколения и началом их активного использования в популяционной геномике (Stapley et al., 2010; Davey et al., 2011).

2) Геномный мониторинг популяционных генофондов сахалинского тайменя, усилий по искусственному разведению и реинтродукции вида. Настоящая работа может быть использована как задел для многолетней программы.

ВЫВОДЫ

1. Генетическая структура популяций сахалинского тайменя формируется на двух основных уровнях: (а) дифференцированных локальных популяций на уровне отдельных водоемов и (б) групп популяций из близких водоемов, вероятно, связанных потоком генов. Средние генетические расстояния D_a между популяциями равняются 0,19 внутри зоогеографических регионов и 0,29 между ними.

2. Выявлено значительное соответствие между генетической кластеризацией групп популяций и зоогеографическим районированием ареала вида, которое позволяет с большей надежностью относить популяции к ранее выявленным генетическими методами группам, что важно при планировании природоохранных мероприятий на ареале вида.

3. Согласно результатам анализа митохондриальных маркеров ДНК, наиболее вероятно, что дивергенция групп популяций сахалинского тайменя (выделенных на основе частот аллелей микросателлитных локусов ДНК) вызвана малой эффективной численностью и ограниченным темпом миграций между группами (обусловленными природно-географическими условиями мест обитания и пр. факторами), а не долговременной изоляцией в ледниковых рефугиумах или современных местах обитания.

4. Эффективная численность большинства исследованных популяций сахалинского тайменя находится на очень низком уровне (в среднем, $N_e \approx 80$). По уровню генетического разнообразия выделяются малые изолированные популяции, демонстрирующие следы деградации генофонда, в то время как большая часть исследованных популяций имеет средний уровень генетического разнообразия. Требуется интенсивная охрана вида и искусственное разведение для увеличения численности этого вида.

5. Работы по реинтродукции и искусственному разведению сахалинского тайменя должны учитывать особенности описанной генетической структуры популяций сахалинского тайменя во избежание деградации популяционных генофондов вида.

Производители должны отбираться из того водоема, в котором планируется выпуск молоди. При невозможности отбора производителей из этого водоёма, они должны быть взяты из популяций того же зоогеографического региона, принадлежащих к одной генетической группе популяций.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Шитова М.В. Панель микросателлитных локусов для популяционных исследований сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort) / М.В. Шитова, **А. А. Юрченко**, Е. Г. Шайхаев, Л.А. Животовский // Генетика. – 2012. – Т. 48, № 8- С. 976-982.

2. Zhivotovsky L. Eco-geographic units, population hierarchy, and a two-level conservation strategy with reference to a critically endangered salmonid, Sakhalin taimen *Parahucho perryi* / L. Zhivotovsky*, **A. Yurchenko***, V. Nikitin, S. Safronov, M. Shitova, S. Zolotukhin, S. Makeev, S. Weiss, P. Rand, A. Semenchenko // Conservation Genetics – 2015. – Т. 16 – № 2 – 431–441с.

Работы, опубликованные в других изданиях

1. **Юрченко А.А.** Популяционно-генетическая дифференциация сахалинского тайменя (*Parahucho perryi*) / **А.А. Юрченко**, М.В. Шитова, А.Ю. Семенченко, Л.А. Животовский // Международная молодежная конференция «Популяционная генетика : современное состояние и перспективы». Материалы конференции. М.: Цифровичок – 2011. – С. 270

2. Zhivotovsky L.A. What is a conservation unit for Sakhalin taimen (*Parahucho perryi*)?: Genetics & Geography / L.A. Zhivotovsky, **A.A. Yurchenko**, M.V. Shitova, A.Yu. Semenchenko, S. F. Zolotukhin, S.N. Safronov // Taimen workshop, 2011, December 9-10, Auckland, New Zealand <http://www.stateofthesalmon.org/pdfs/4_Zhivotovsky.pdf>

3. **Юрченко А.А.** Популяционно-генетическая структура сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856) по 19 микросателлитным локусам ДНК и выводы для сохранения вида / **А.А. Юрченко**, М.В. Шитова, А.Ю. Семенченко, С.Ф. Золотухин, С.Н. Сафронов, Л.А. Животовский // V Всероссийский медико-биологический Конгресс молодых учёных с международным участием «Симбиоз-Россия 2012». 03-08 декабря 2012 г. Тверь. С. 134-135

4. **Юрченко А.А.** Популяционно-генетическая структура сахалинского тайменя *Parahucho perryi* Brevoort, 1856 по 19 микросателлитным локусам ДНК и выводы для сохранения популяционных генофондов вида / **А.А. Юрченко**, М.В. Шитова // Материалы Международного молодежного научного форума "ЛОМОНОСОВ-2013" / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, К.К. Андреев, М.В. Чистякова. [Электронный ресурс]. г. Москва: МАКС Пресс, 2013. С.