

На правах рукописи

ТЕТЕРИНА Анастасия Алексеевна

**Генетическая история малой изолированной популяции
атлантической трески *Gadus morhua* острова Кильдин**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2016

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, заведующий лабораторией эволюционной генетики развития Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук», г. Москва

КУЛИКОВ Алексей Михайлович

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией эволюционной экологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук», п. Борок

СЛЫНЬКО Юрий Владиславович

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

Защита состоится «20» декабря 2016 г. в _____ 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 «_____» _____ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Татьяна Аркадьевна Синельщикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Атлантическая треска *Gadus morhua* играет ключевую роль в морских экосистемах Северо-Европейского бассейна и атлантического побережья Северной Америки (Бойцов и др., 2003). Треска – морская рыба, однако у неё описано несколько изолированных популяций, населяющих солоноватые либо меромиктические прибрежные озера (Харди и др., 2008), в том числе озеро Могильное на острове Кильдин в Баренцевом море. Озеро полностью изолировалось от Баренцева моря: по геологическим данным от тысячи до двух тысяч лет назад. Кильдинская треска – эндемик озера Могильное, занесена в Красную книгу России со статусом «исчезающие виды» (Шилин, 2001). Кильдинская треска обитает в узком промежуточном соленом слое озера, запертая между верхним опресненным и нижним ядовитым сероводородным слоем. Она отличается от морской трески морфологически, физиологически, поведенчески (Цееб 1975а). Однако особенности происхождения, возраст и дальнейшая эволюционная история популяции не были известны. А это является ключевым моментом для понимания ее состояния в настоящее время.

Степень разработанности темы исследования. Кильдинская треска таксономически описана как *Gadus morhua kildinensis* в 1920 году К.М. Дерюгиным (Дерюгин 1920), изучена ее морфология, экология, характер питания, образ жизни («Реликтовое озеро...» 1975). В ранее проведенных молекулярно-генетических исследованиях кильдинской трески были изучены изоферментные маркеры (Новиков и др., 2006б), отмечено сниженное микросателлитное разнообразие по 8 маркерам в выборке из 15 особей (Строганов и др., 2011), проанализированы 4 особи кильдинской трески по локусу *PanI* (Fevolden *et al.*, 2012). Таким образом, на момент начала данного исследования было недостаточно генетических данных для оценки состояния и изучения генетико-демографической истории кильдинской трески.

Целью данной работы было изучить происхождение, демографическую историю и оценить генетическое состояние популяции кильдинской трески. Для выполнения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1) сбор материала и организация экспедиции на озеро Могильное;

- 2) подбор микросателлитных маркеров по литературным данным, разработка маркеров для мтДНК и маркеров для определения экотипов;
- 3) проведение молекулярно-генетического анализа озерной и морской трески по микросателлитным и другим ядерным локусам, а также митохондриальным маркерам;
- 4) проведение полногеномного секвенирования кильдинской трески;
- 5) проведение популяционно-генетического и биоинформатического анализа полученных данных и оценка генетического состояния популяции кильдинской трески;
- 6) оценка времени изоляции и демографической истории популяции трески озера Могильное;
- 7) разработка мер по сохранению популяции кильдинской трески.

Научная новизна. В данной работе впервые анализируется большое количество особей кильдинской трески по ядерным и митохондриальным маркерам; проведено её полногеномное секвенирование; сравнение с мигрирующим и стационарным экотипами трески; оценены её популяционно-генетические параметры по большому набору генетических маркеров; проанализирована её генетико-демографическая история.

Теоретическая и практическая значимость. Изучение эволюционных и экологических последствий длительной изоляции атлантической трески, а также истории колонизации изолированных водоемов, является интересной и важной научной задачей, позволяющей узнать больше о возможности адаптации трески и других видов морских рыб к экстремальным условиям обитания. Важное практическое значение имеет оценка генетического состояния краснокнижной популяции кильдинской трески в настоящее время, чтобы используя эти оценки отслеживать динамику ее состояния в будущем. В данном исследовании разработана панель локусов для всех трех основных геномных регионов, вероятно, ассоциированных с локальными адаптациями стационарного и мигрирующего экотипов трески (Berg *et al.*, 2016), и позволяющая перейти к широким эколого-ихтиологическим исследованиям атлантической трески.

Личный вклад автора. Вклад автора заключается в сборе биологического материала, проведении молекулярно-генетического анализа, разработке новых маркеров, проведении популяционно-генетического анализа ДНК-маркеров и биоинформатического анализа полногеномных данных, интерпретации результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Кильдинская треска произошла от мигрирующего экотипа трески, а время дивергенции от предковой морской популяции составляет приблизительно 1800 лет (330 поколений).
2. Оцененная эффективная численность популяции трески оз. Могильное составляет 107 особей, что на два порядка меньше, чем эффективная численность морской популяции атлантической трески.
3. Генетическое разнообразие кильдинской трески по микросателлитным и полногеномным данным снижено более чем в три раза по сравнению с морской популяцией.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены автором на международной конференции «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» (г. Ростов-на-Дону, 2013г.), школе «Актуальные вопросы рационального использования водных биологических ресурсов» (г. Звенигород, 2013), международной школе-конференции «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2013), международных конференциях «Moscow Conference on Computational Molecular Biology» (г. Москва, 2015) и «Genome Evolution Conference» (Rehovot, Israel, 2016). Материалы работы были представлены на сессиях аспирантов, семинарах лаборатории генетических проблем идентификации ИОГен РАН в 2012-2015гг. Апробация работы проходила 29 сентября 2016 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН. По результатам работы вышло 2 статьи в изданиях рекомендованных ВАК, одна работы находятся в печати и еще одна работа готовится в печать.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В Главе 1 «Обзор литературы» приведены сведения о биологических и генетических особенностях экотипов атлантической трески, приведены сведения о популяциях трески из озер, описаны особенности жизни и места обитания кильдинской трески, а также даны характеристики основных популяционно-генетических процессов, происходящих в малых популяциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор материала

В работе были использованы выборки *Gadus morhua*, собранные в экспедициях сотрудниками Лаборатории генетических проблем идентификации ИОГен РАН, ПИНРО и МГУ. Количество особей, время и место взятия проб указано в таблице 1. После поимки рыб отрезался небольшой фрагмент спинного плавника, который фиксировался в 96% этаноле. Образцы хранились при -20°C. Треска озера Могильное занесена в Красную книгу Российской Федерации, поэтому вылов и сбор материала осуществлялся с разрешения Росприроднадзора, после поимки все особи были возвращены в водоем.

Таблица 1 – Некоторые характеристики исходного материала.

№	Обозначение	Место взятия проб	Координаты	Год сбора	Кол-во, экз.
1-3	MOG00, MOG11, MOG12	оз. Могильное	69° 19' с.ш. 34° 20' в.д.	2000, 2011,2012	15, 37, 33
4	KS11	Кильдинская салма	69° 19' с.ш. 34° 25' в.д.	2011	77
5	KS12	Кильдинская салма	69° 18' с.ш. 34° 26' в.д.	2012	24
6	BS12	Баренцево море	70° 36' с.ш. 34° 17' в.д.	2012	24
7	WS12	Великая салма, Белое море	66° 45' с.ш. 33° 03' в.д.	2012	24

Молекулярно-генетические методы

Тотальную ДНК выделяли из небольшого фрагмента плавника с помощью реагентов Diatom DNA Prep 200 («Лаборатория ИзоГен» Россия), далее ДНК хранилась при -20°C.

Для популяционно-генетического анализа все образцы трески были генотипированы по 15 микросателлитным маркерам: *Gmo3*, *Gmo8*, *Gmo19*, *Gmo34*, *Gmo35*, *Gmo-G12*, *Gmo-G18*, *PGmo32*, *Gmo-C172*, *Gmo-C193*, *PGmo71*, *PGmo95*, *PGmo104*, *Gmo-C20*, *GmoUCC-11*. Также было проведено секвенирование по Сэнгеру фрагментов митохондриальной ДНК *ND2/tRNA-Trp/tRNA-Ala* и *cytb* и ядерных локусов *PanI*, *PACSIN3*, *AQP11*.

Для полногеномного секвенирования был подготовлен пул геномной ДНК из 33 особей кильдинской трески, смешанной в равных пропорциях (MOG). Контроль качества, подготовка библиотеки и секвенирование (парные чтения, 100+100 нуклеотидов) на платформе Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc.) проведены в КНР в Пекинском институте геномики (Beijing Genomics Institute, <http://www.genomics.cn/en/>). Дополнительно были использованы полногеномные последовательности группировок северо-восточной арктической трески и прибрежной норвежской трески (NEAC и NCC, Karlsen *et al.*, 2013), полученные из базы SRA (SRX110586 и SRX110509), и полногеномные последовательности из работы Кирубакарана и др., (Kirubakaran *et al.*, 2016), из базы ENA (PRJEB12803).

Анализ демографической истории и численности

Количество взрослых особей в озерной популяции оценивалось методом «поймка-метка-повторная пойма» («capture-mark-recapture»; Krebs, 1999), по результатам выловов особей в экспедициях на остров Кильдин в 2011 и 2012 гг. Определение эффективной численности проводилось в программе NeEstimator.v.2 (Do *et al.*, 2014). Оценка долговременной эффективной численности и времени дивергенции популяций проводилась в программе DIYABC.v.1.0 (Cornuet *et al.*, 2010) по микросателлитным данным. Анализ демографической истории проводился в Bottleneck (Luikart, Cornuet, 1998), также рассчитывались индексы неустойчивости (Kimmel *et al.*, 1998) и индекс экспансии (Zhivotovsky *et al.*, 2000), их доверительные интервалы определялись с помощью медианных статистик (Sachs *et al.*, 1982).

Анализ генетической дифференциации популяций

Оценка несмещенных значений F_{ST} проводилась в программе GDA (Lewis, Zaykin 2001). Анализ главных компонент (PCA) по мультилокусным генотипам особей проводился в программе Genetix v.4.0 (Belkhir *et al.*, 1996-2004). Анализ главных координат (PCoA) и анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) проводились в программе GenAlEx4.5 (Peakall, Smouse, 2006). Байесовская кластеризация индивидуальных мультилокусных генотипов осуществлялась в программе Structure v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), выбор оптимального количества кластеров проводился в сервисе Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>), а визуализация полученных разбиений – в сервисе CLUMPAK (<http://clumpak.tau.ac.il/>). Межпопуляционные различия по полногеномным данным оценивались с помощью статистики F_{ST} , а достоверность этих различий – с помощью точного теста Фишера в программе PoPoolation2 (Kofler *et al.*, 2011). Последующий анализ результатов проводился в среде R (R Development Core Team, 2008).

Анализ внутривидовой изменчивости

Основные статистики аллельного разнообразия оценивались по микросателлитным данным в GenAlEx4.5. Оценка гаплотипического и нуклеотидного разнообразия митохондриальной ДНК и их стандартных ошибок проводилась в *DNASP 5.10.1* (Rozas *et al.*, 2003). Филогенетические деревья по митохондриальным маркерам строились методом ближайшего соседа (*Neighbour joining*) по p-расстояниям в программе MEGA.6 (Tamura *et al.*, 2013) и далее преобразовывались в генетические сети в программе HaploType Viewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>).

Контроль качества последовательностей, полученных секвенированием второго поколения, проводился программой FastQC (Andrews, 2010), удаление нуклеотидов с низким качеством ($Phred < 20$) и фильтрация чтений по длине (менее 36 нуклеотидов) проводились с программой fastq-mcf (Aronesty, 2011). Картирование последовательностей на геном выполнялось с помощью программы bowtie2 (Langmead, Salzberg, 2012). Сортировка и фильтрация по качеству ($MQ < 30$) полученных выравниваний проводились пакетом samtools v1.3.1 (Li *et al.*, 2009), дедупликация чтений осуществлялась программой picard MarkDuplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard>). Выявление

однонуклеотидных полиморфизмов и небольших вставок и делеций выполнялось в программе FreeBayes (Garrison, Marth, 2012). Фильтрация файлов с вариантами проводилась в vcftools (Danecek *et al.*, 2011). Аннотация и предсказание возможных эффектов от вариантов была проведена программой SnpEff (Cingolani *et al.*, 2012). Функциональная аннотация по базе Gene Ontology и анализ представленности функциональных классов генов проводились с помощью R пакетов biomaRt (Durinck *et al.*, 2009) и topGo (Alexa, Rahnenfuhrer, 2016).

Внутрипопуляционное разнообразие оценивалось по полногеномным данным с помощью статистик π и D (Tajima 1989) в PoPoolation.v.1 (Kofler *et al.*, 2011), анализ и визуализация проводились в статистической среде R. Поиск регионов, которые потенциально могли находиться под отбором, осуществлялся с помощью pool-HMM (Voitard *et al.*, 2013).

Сравнение кильдинской трески с экотипами атлантической трески

Сравнение трески с экотипами проводилось по локусам, которые показали достоверную дифференциацию между мигрирующим и стационарным экотипом (SNP-outliers), определенным в работе Берга и др., (Berg *et al.*, 2015). Соответствие аллельных вариантов маркеров экотипам определялось по данным Берга (Paul Ragner Berg, личное сообщение). Последовательности, полученные при полногеномном секвенировании 33 особей кильдинской трески, были картированы с помощью программы bowtie2 на последовательности маркеров, использованных в работе Берга и др., (Berg *et al.*, 2015), получены из базы данных dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Поиск нуклеотидных вариантов проводился в программе FreeBayes. Далее все маркеры были классифицированы как «стационарный», «мигрирующий» или «полиморфный». Было проведено индивидуальное генотипирование по регионам LG1, LG2 и LG7 для проверки результатов, полученных по смешанным полногеномным данным, а также точного определения частот вариантов в популяции. Для этого были разработаны пары праймеров для гена *PanI* (LG1), *PACSIN3* (LG2, включает маркер *ss1712298457*) и *AQP11* (LG7, включает маркер *ss1712304271*). Генотипирование проводилось с помощью множественного выравнивания хроматограмм по данным фрагментам на соответствующие им референсы в программе Geneious 4.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Внутрипопуляционное разнообразие кильдинской трески

В результате полногеномного секвенирования 33-х особей озерной трески было получено 61131381 пар чтений. Последовательности находятся в базе данных NCBI SRA, номер эксперимента SRX1837663. Средняя глубина покрытия референса *gadMor1* была 18.8. Для изучения внутрипопуляционного разнообразия кильдинской трески было проанализировано 489458 участков генома (60% генома), среднее внутрипопуляционное разнообразие π равнялось 0.0012 ± 0.0025 , что приблизительно в четыре раза меньше, чем у морских выборок из работы Карлсена и др. (Karlsen *et al.*, 2013). Внутрипопуляционное разнообразие кильдинской трески низкое по всему геному, на рисунке 1 показано разнообразие по 23 группам сцепления.

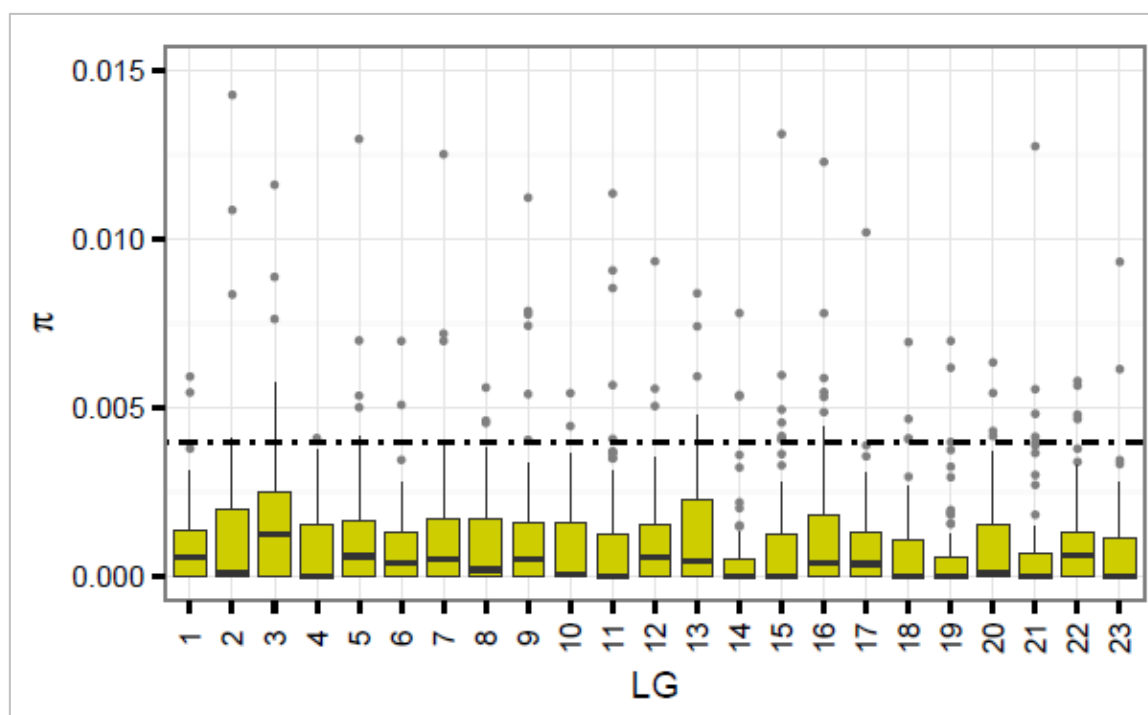


Рисунок 1 – Распределение π (Tajima, 1989) по 23 группам сцепления у кильдинской трески. Пунктирной горизонтальной линией отмечен верхний 95-перцентиль (0.0041).

Для регионов, сохранивших наибольшую изменчивость, а именно – для выходящих за пределы верхней 95%-й границы распределения статистики π (рис. 1), был проведен функциональный анализ генов. Однако, у кильдинской трески не было обнаружено значимо преобладающих функциональных групп генов. Полногеномный поиск с помощью алгоритма pool-hmm регионов, которые обладают повышенным разнообразием и, возможно, находятся под направленным отбором у озерной трески, не выявил подобных участков.

Сравнение кильдинской трески с прибрежной и глубоководной треской.

Среднее значение F_{ST} между популяцией трески озера Могильное и фьордовой выборкой (NCC), популяцией трески Могильное и баренцевоморской выборкой (NEAC) и между данной парой морских выборок составило соответственно. 0.183 ± 0.177 , 0.189 ± 0.178 и 0.030 ± 0.028 (рисунок 2, А). Суммарно было обнаружено 18697 регионов, для которых р-значения с поправкой на множественные сравнения меньше 0.005, и соответствуют 3012 геномным скаффолдам (рис 2, Б). В данных регионах не было обнаружено достоверно преобладающих функциональных групп генов по классификации базы Gene Ontology.

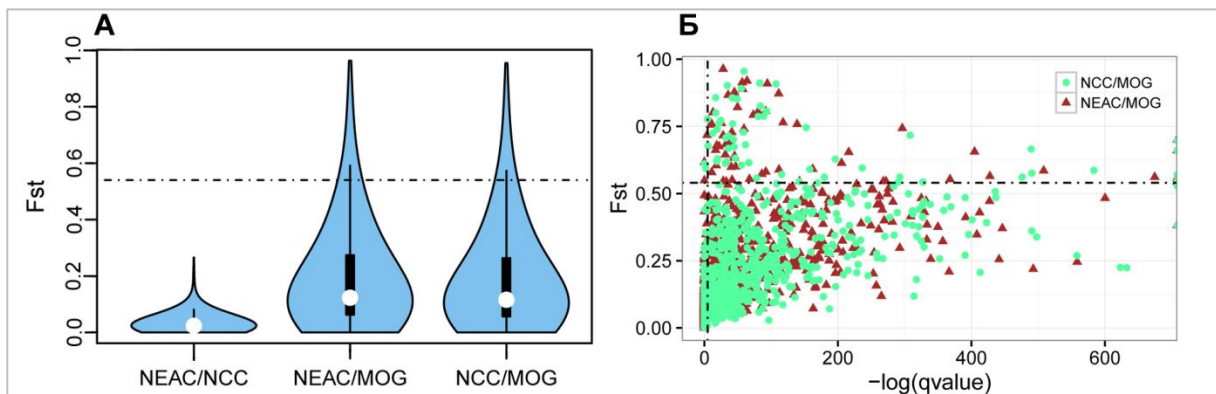


Рисунок 2 – Дифференциация кильдинской трески от морских выборок. А – скрипичная диаграмма F_{ST} между кильдинской треской (MOG) и NEAC- и NCC-выборками. Пунктирной линией обозначен 95-перцентиль F_{ST} между озерной и морской выборками. Б – распределение значений F_{ST} между озерной и морской выборками и логарифма q-value. Обозначения как в А.

Сравнение кильдинской трески с экотипами атлантической трески

У кильдинской трески были изучены три геномные инверсии, LG1, LG2 и LG7, которые, вероятно, ассоциированы с локальными адаптациями и с дифференциацией мигрирующего и стационарного экотипов (Berg *et al.*, 2016). После фильтрации данных по глубине покрытия и качеству, были определены аллельные варианты для 39 маркеров в LG1, 15 маркеров LG2 и 37 маркеров LG7. В регионе LG1 у кильдинской трески были обнаружены оба варианта, стационарный и мигрирующий. В регионы LG2 и LG7 были мономорфны и соответствовали мигрирующему варианту. Данный результат был подтвержден с помощью индивидуального генотипирования 33-х особей кильдинской трески (выборка MOG12). Частота стационарного аллеля в локусе *PanI* (регион LG1) в

выборке озерной трески составила 0.8, наблюдаемая гетерозиготность – 0.33. Треска из Кильдинской салмы (KS12) была полиморфна по всем трем изучаемым маркерам. Частота стационарного варианта и наблюдаемая гетерозиготность *PanI* -локуса были, соответственно, 0.55 и 0.9, *PACSIN3*-локуса – 0.15 и 0.29 и локуса *AQP11* – 0.06 и 0.13. Дифференциация по локусам *PanI*, *PACSIN3* и *AQP11* для кильдинской трески, и разных выборок морской трески представлены на рисунке 3.

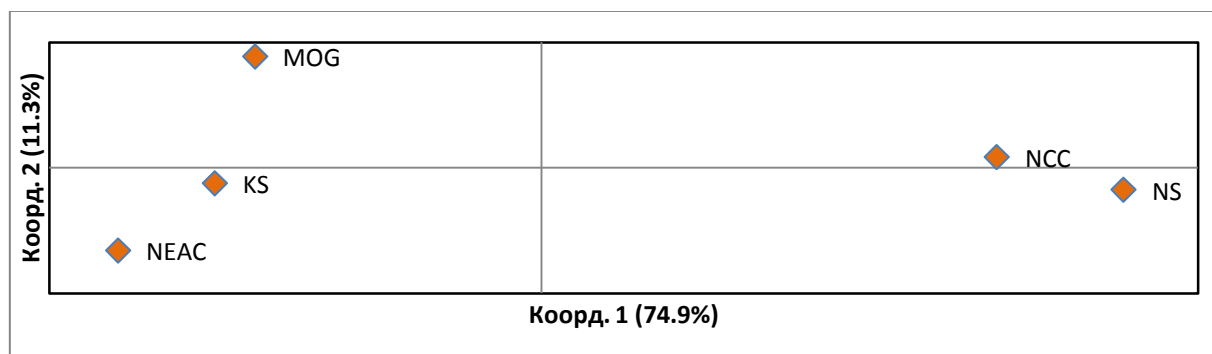


Рисунок 3 – Дифференциация выборок по локусам *PanI* (LG1), *PACSIN3* (LG2) и *AQP11* (LG7). Обозначения: MOG – треска озера Могильное, KS – треска Кильдинской салмы (KS12), NEAC - выборка трески Баренцева моря, NCC – выборка из фьордов Норвегии, NS – треска Северного моря. Частоты для NEAC, NCC и NS взяты из работы Berg et al., 2016.

Оценка микросателлитного генетического разнообразия

Среднее количество аллелей по микросателлитным локусам в исследованных выборках изменяется от 1.67 (в озере Могильном) до 9.113 (Кильдинская салма 2011). У кильдинской трески снижено число аллелей по всем 15 исследованным локусам, суммарно в озерной популяции выявлено 26 аллелей, а в морской – 176. На рисунке 4 изображены статистики по микросателлитным локусам в исследуемых выборках. Все аллели, обнаруженные в популяции озерной трески, встречаются в морской популяции. Но мультилокусное сочетание, вероятно, уникально для кильдинской трески, т.к. суммарная теоретическая частота подобных генотипов в морской популяции варьирует от 4.4×10^{-12} до 1.9×10^{-11} . Значения наблюдаемой гетерозиготности в морских выборках от 0,60 до 0,64, среднее значение H_e равно 0.63. У трески озера Могильное значение гетерозиготности меньше почти в три раза, среднее значение H_e по всем озерным выборкам равно 0.23.

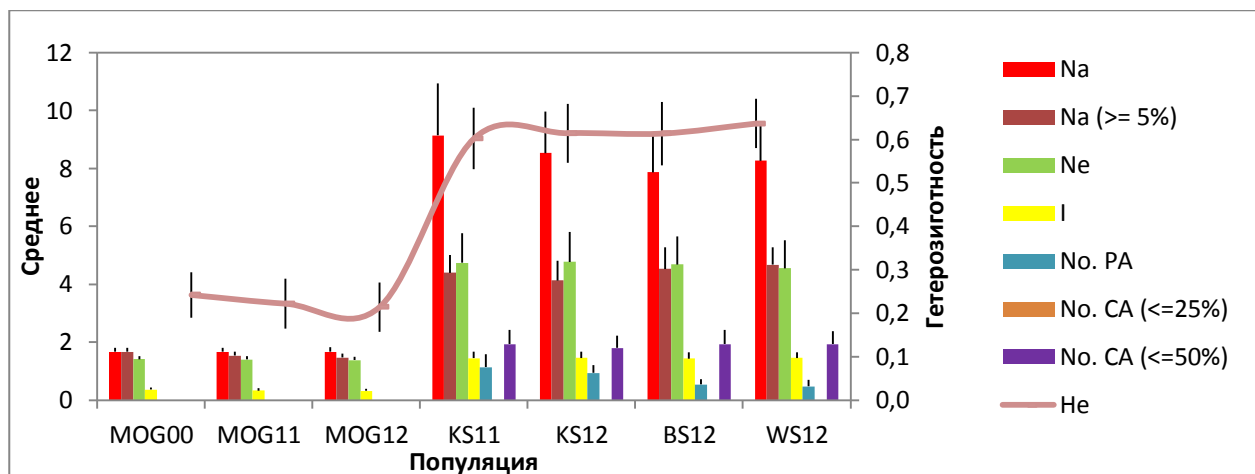


Рисунок 4 – Аллельные паттерны в выборках атлантической трески. Na – среднее количество аллелей; Na (>= 5%) – среднее количество аллелей с частотой более 5%; Ne – среднее эффективное число аллелей, I – индекс Шеннона, No. PA – количество уникальных аллелей; No. CA(<=25%) и No. CA(<=50%) – количество аллелей, распространенных не менее чем в 25% и в 50% исследованных популяций; He – ожидаемая гетерозиготность.

Генетические различия между кильдинской и морской треской

Между выборками кильдинской трески разных лет не было обнаружено генетических различий (F_{ST} от -0.006 до 0.043, p -значение с корректировкой на множественное сравнение более 0.1). Была показана значимая дифференциация между озерной и морской треской (F_{ST} от 0.276 до 0.038, p -значение менее 0.005), значения F_{ST} между озерной и морской треской приблизительно в четыре раза превышают значения F_{ST} между морскими выборками (таблица 2). Между всеми выборками морской трески была также показана достоверная подразделенность, кроме пар KS11/KS12 и KS11/BS12.

Таблица 2 – Генетическая дифференциация между выборками трески. Над диагональю F_{ST} (WC84), под диагональю значения уровня значимости с поправкой Бонферрони. Обозначения: н/з – не значимо (>0.1); названия выборок соответствуют таблице 1.

	MOG00	MOG11	MOG12	KS11	KS12	BS12	WS12
MOG00		0,0426	0,0359	0,2764	0,3129	0,3019	0,2912
MOG11	н/з		-0,0058	0,3274	0,3799	0,3717	0,3467
MOG12	н/з	н/з		0,3238	0,3739	0,3660	0,3435
KS11	0,0021	0,0021	0,0021		0,0052	0,0111	0,0259
KS12	0,0021	0,0021	0,0021	н/з		0,0158	0,0199
BS12	0,0021	0,0021	0,0021	н/з	0,0210		0,0410
WS12	0,0021	0,0021	0,0021	0,0021	0,0021	0,0021	

Для изучения подразделенности трески был использован анализ главных компонент по особям (рис. 5), было показано, что треска разделяется на 2 группы, в первую группу входят представители озерной популяции, во вторую – группы особи из морских выборок. На рисунке 6 показан анализ главных координат по выборкам, все морские выборки значительно отделяются от озерной. Процент межгрупповых молекулярных различий между выборками Баренцева и Белого моря соответствовал 3%. Достоверность разбиения на морскую и озерную треску также подтверждалась анализом AMOVA.

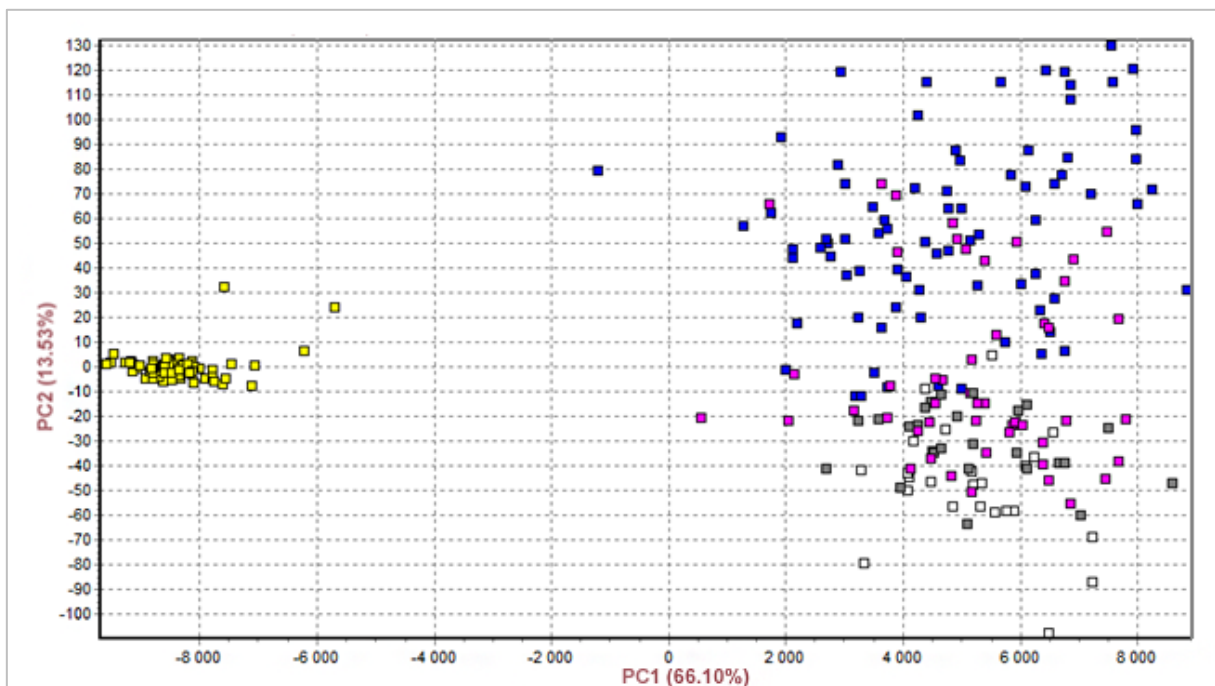


Рисунок 5 – Анализ главных компонент. Обозначения: желтым цветом показаны особи из озера Могильное (MOG00, MOG11, MOG12), белым – KS12, фиолетовым – WS12, серым – BS12, синим-KS11. Названия выборок соответствуют таблице 1.



Рисунок 6 – Анализ главных координат по исследуемым выборкам. Обозначения выборок как в таблице 1. При расчете использовано генетическое расстояние Нея (Nei, 1972).

На рисунке 7 изображены апостериорные вероятности принадлежности трески к определенному кластеру (каждый кластер обозначен своим цветом). Хорошо заметно, что все особи разделяются на два кластера, один соответствует озерной треске, другой – морской.

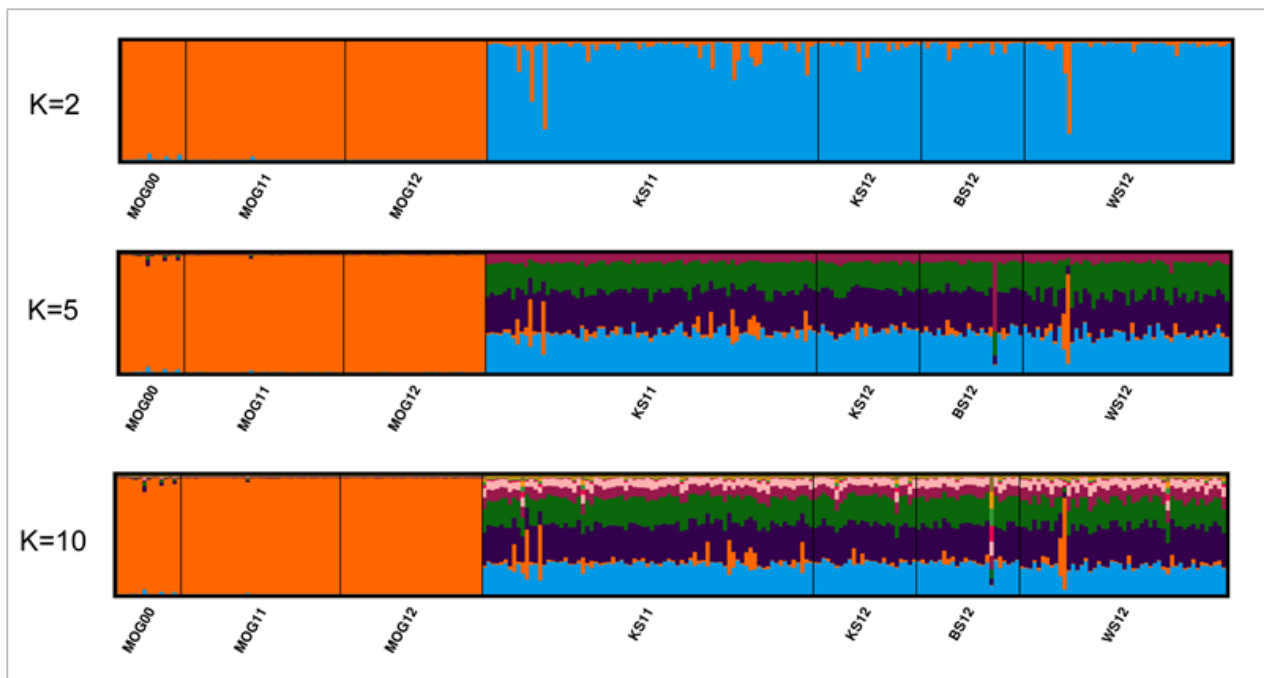


Рисунок 7 – Апостериорная вероятность принадлежности к кластерам (K) для значений K=2 (наилучшее разбиение), K=5 и K=10. Обозначения выборок соответствуют таблице 1.

Оценка численности кильдинской трески

По данным эхолотной съемки в экспедиции 2012 года число взрослых особей было 250-300 шт. Согласно методу «отлова – маркировки – повторного отлова», количество взрослых особей в озере Могильном составляло 184 с 95% доверительным интервалом от 97 до 462, что хорошо согласуется с результатами эхолотной съемки и более ранними литературными данными. Долговременная эффективная численность кильдинской трески достаточно низкая, медианное значение – 107 особей с широким доверительным интервалом. Эффективная численности трески из Кильдинской салмы больше, чем у озерной трески, на два порядка (таблица 3). Эффективная численность кильдинской трески в настоящее время составила 183 особей с нижней оценкой 27 особей. Аналогичная средняя оценка для морской популяции (по выборкам из Кильдинской салмы) значительно больше, нижняя оценка составила 496 особей.

Таблица 3 – Оценки и доверительные интервалы долговременной эффективной численности и времени дивергенции озерной трески от морской.

	Среднее	Медиана	Мода	Тип доверительного интервала	Значения доверительного интервала
Эффективная численность кильдинской трески	135	107	60	95 % CI	[26, 392]
				90 % CI	[32, 302]
				50 % CI	[66, 166]
Эффективная численность морской трески (Кильдинская салма)	1.68×10^4	1.57×10^4	1.23×10^4	95 % CI	$[0.32 \times 10^4, 3.67 \times 10^4]$
				90 % CI	$[0.45 \times 10^4, 3.28 \times 10^4]$
				50 % CI	$[1.01 \times 10^4, 2.22 \times 10^4]$
Время дивергенции озерной трески от морской (t_a поколений)	384	330	114	95 % CI	[62, 929]
				90 % CI	[80, 868]
				50 % CI	[85, 545]

Демографическая история кильдинской трески

Методом Лукарта и Корнета (Luikart, Cornuet, 1998), примененным в программе Bottleneck, а также с помощью доверительных интервалов индексов экспансии (Zhivotovsky *et al.*, 2000) и неустойчивости (Kimmel *et al.*, 1998), ни для одной из исследуемых популяций не было обнаружено недавнего резкого изменения численности (в том числе сокращения или «бутылочного горлышка»).

Оценка времени дивергенции озерной и морской трески

В ABC-анализе была использована простая модель, которая предполагает, что озерная треска и треска из Кильдинской салмы произошли от общей популяции и разделились t_a поколений назад. Медианное время разделения популяций озерной и морской трески составило 330 поколений (таблица 3). Если считать, что поколение трески равняется 5-6 годам, то кильдинская треска отделилась 1800 лет назад с 50% доверительным интервалом от 500 до 3000 лет.

Анализ генетического разнообразия митохондриальной ДНК озерной и морской трески

В выборках морской трески (KS11, KS12) было обнаружено 31 гаплотип фрагмента *ND2/tRNA-Trp/tRNA-Ala* и 14 гаплотипов фрагмента *cytB*. В популяции же кильдинской трески не было изменчивости по данным фрагментам мтДНК. На рисунке 8 показана медианная гаплотипическая сеть по фрагменту *ND2/tRNA-Trp/tRNA-Ala*, фрагменту *cytB* и по объединенному гаплотипу обоих фрагментов. Все полученные последовательности депонированы в GenBank под номерами KP293228–KP293417.

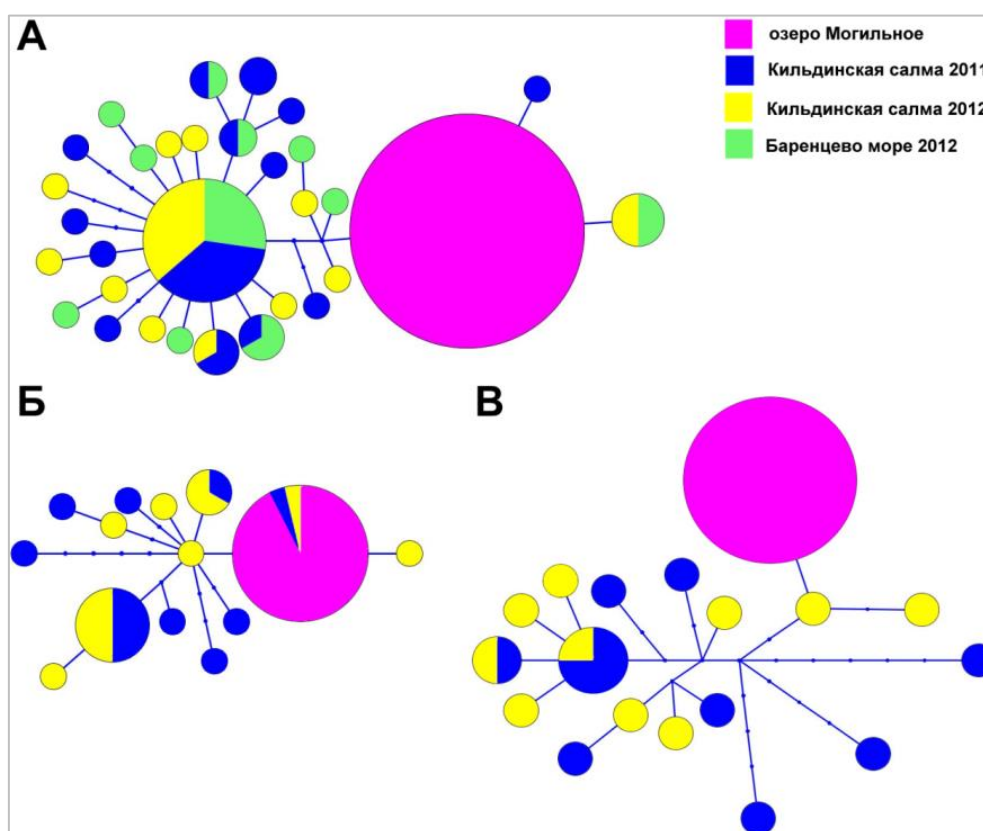


Рисунок 8 – Изменчивость мтДНК трески. А – медианная гаплотипическая сеть, по фрагменту *ND2/tRNA-Trp/tRNA-Ala*, Б – по фрагменту *cytB*, В – по объединённым гаплотипам.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Происхождение кильдинской трески

Ключевые отличия между мигрирующим и стационарным экотипами трески – это глубина их обитания и протяженность нерестовых и пищевых миграций (Nordeide *et al.*, 2011). В работе Берга и соавторов (Berg *et al.*, 2016)

у атлантической трески были идентифицированы три полиморфных протяженных геномных региона-инверсии (LG1, LG2 и LG7), по которым стационарный и мигрирующий экотипы трески отличаются друг от друга генетически. По полногеномным данным было определено, что «островок дивергенции» в LG1 полиморфен у озерной трески. А при индивидуальном генотипировании было установлено, что в популяции кильдинской трески преобладает стационарный аллель PanI^A (частота 0.8) и нет отклонения от равновесия Харди-Вайнберга. Наши результаты не противоречат данным предыдущего исследования, где были изучены 4 особи кильдинской трески по LG1 и показано, что три из них гомозиготны по стационарному варианту и одна гетерозиготна (Fevolden *et al.*, 2012). По результатам полногеномного анализа и последующей индивидуальной проверки было показано, что все особи кильдинской трески соответствуют мигрирующему варианту инверсий в LG2 и LG7. Частоты вариантов по двум данным геномным регионам сильно различаются между экотипами (Bradbury *et al.*, 2010, 2014; Berg *et al.*, 2015, 2016). Поскольку у кильдинской трески представлен мигрирующий вариант регионов LG2 и LG7, вероятно, что она произошла от мигрирующей баренцевоморской трески. Решение вопроса о происхождении кильдинской трески (от мигрирующего экотипа) позволяет нам использовать выборки морской трески из Баренцева моря и Кильдинской салмы для оценки времени изоляции кильдинской трески от родительской морской популяции, т.к. в них преобладает мигрирующий экотип трески. Этому положению не противоречит то, что у кильдинской трески наблюдается полиморфизм в «островке дивергенции» LG1, поскольку в баренцевоморской популяции этот регион также полиморфен (Berg *et al.*, 2016).

В результате моделирования разделения озерной популяции от морской методами приближенных байесовских вычислений (таблица 3) было показано, что вероятное время дивергенции данных популяций – 330 поколений. Если считать длину поколения трески 5-6 лет (Мухина и др., 2002), то треска из озера Могильное отделилась от морской популяции около 1800 лет назад. Оценка согласуется с геологической датировкой отделения озера Могильное от Баренцева моря (1000-2000 лет назад; Гуревич, Лийва, 1975; Mityaev *et al.*, 2008). Весь данный периода кильдинская треска была полностью репродуктивно изолирована от морской популяции.

Генетическая дивергенция озерной и морской трески

По микросателлитным и полногеномным данным кильдинская треска сильно отличается от морской трески. Дифференциация между ними заметна как на индивидуальном уровне (анализ главных компонент, байесовский кластерный анализ), так и при рассмотрении выборок и популяций в целом (с помощью статистики F_{ST} и анализа главных координат). Байесовский кластерный анализ (рис. 7) и анализ главных компонент (рис. 5) показали, что все исследуемые особи разделяются на две группы: озерную и морскую.

При анализе дифференциации морских выборок и озерных по микросателлитным данным (табл. 2, рис. 6) было показано следующее:

- 1) между выборками кильдинской трески разных лет нет дифференциации;
 - 2) имеется значимая дифференциация между озерной выборкой и всеми морскими выборками, причём значения F_{ST} между озерной и морской треской в четыре раза превышают F_{ST} между морскими выборками;
 - 3) между выборками морской трески есть статистически значимая подразделенность, кроме пар выборок KS11 с KS12 и KS11 с BS12.
- Дифференциация кильдинской трески от трески из фьордовой выборки (NCC) и от трески баренцевоморской выборки (NEAC), оцененная по полногеномным данным, была в 4 раза больше, чем между этими морскими выборками (рис. 2), что совпадает с оценками по микросателлитным данным. В популяции кильдинской трески при анализе фрагментов митохондриальной ДНК не было выявлено изменчивости, все особи имели одинаковый гаплотип. В морской же популяции данные регионы были достаточно изменчивы (рис. 8). Вследствие наследования митохондриальной ДНК по материнской линии, эффективная численность по мтДНК вчетверо меньше, чем по ядерным генам (Birky *et. al.*, 1989). Поэтому, при одинаковой интенсивности дрейфа, например, в случае длительной низкой численности, разнообразие по мтДНК быстрее изменяется, чем по ядерным генам (Wilson *et. al.*, 1985). Таким образом, отсутствие изменчивости по митохондриальным маркерам и близость озерного гаплотипа к морским гаплотипам указывает на действие сильного генетического дрейфа.

Популяционно-генетические характеристики кильдинской трески

Согласно методу «поймка – метка – повторная пойма», основанному на количестве повторно пойманных меченых рыб, численность кильдинской

трески (взрослых рыб) составила нескольких сотен с 95% доверительным интервалом от 97 до 462 особей. По данным эхолотной съемки в нашей экспедиции на остров Кильдин в 2012 года число взрослых особей было в тех же пределах: 250-300 шт.; эти оценки согласуются также с данными съемок 1997-2000 годов («Реликтовое озеро...» 2002). Эффективная численность трески озера Могильное не превышает одну-две сотни особей. А эффективная численность баренцевоморской популяции составляет несколько десятков тысяч особей, т.е. превосходит N_e кильдинской трески на два порядка (таблица 3). При этом отношение N_e/N (где N - число половозрелых особей в популяции) у трески озера Могильное намного выше, чем N_e/N в морских популяциях (Palstra, Fraser 2012; Frankham *et al.*, 2014). При анализе демографической истории кильдинской трески было показано, что у нее не происходило резкого изменения численности в прошлом.

Генетическое разнообразие озерной и морской трески

Ожидаемая гетерозиготность по микросателлитным маркерам у кильдинской трески H_e составило 0.226, а в Баренцевом и Белом морях H_e , соответственно, 0.616 и 0.637 (рис. 4), т.е. в озерной популяции она снижена почти в три раза по сравнению со средней оценкой для исследованных нами морских популяций. Среднее внутривидовое разнообразие у кильдинской трески было низкое по всему геному (рис. 1) и равнялось 0.0012, что приблизительно в четыре раза меньше, чем у морских выборок из Баренцева моря и норвежских фьордов (NEAC и NCC, Karlsen *et al.*, 2013). Таким образом, можно заключить, что генетическое разнообразие кильдинской трески меньше, чем у морской трески, в 3-4 раза.

Стоит указать на естественное сходство популяционно-генетических характеристик популяции трески озера Могильное с данными других исследований озерных популяций трески. В канадских озерах Огак, Тариуярусик и Квазигиалиминик популяции трески имели ценозную численность в несколько тысяч особей при эффективной численности около тысячи особей, что на порядок превышает характеристики кильдинской трески. Таким образом, среди изученных озерных популяций атлантической трески, кильдинская треска является самой маленькой по размеру изолированной популяцией. Столь малая численность и длительная изоляция кильдинской

трески привели к тому, что ее генетическое разнообразие данной заметно ниже, чем в популяциях трески канадских озер (Hardie *et al.*, 2006).

В связи с особенностями эволюционной истории, биологии и экологии кильдинской трески помимо традиционных ихтиологических исследований, был проведен ряд популяционно-генетических исследований (Новиков 2006, Строганов и др., 2011, Andreev *et al.*, 2015). В частности, в последней работе Андреева и др., получены сходные с нашими оценки эффективной численности, времени изоляции и генетического разнообразия по микросателлитным маркерам кильдинской трески.

Поиск геномных регионов, находящихся под отбором у кильдинской трески

Поиск геномных регионов, находящихся под направленным отбором, проводился с помощью т.н. скрытых марковских моделей (*hidden Markov model*), однако с помощью данного метода (в озерной популяции) не было найдено ни одного такого региона. Полученный результат согласуется с положением о том, что основные процессы в малых популяциях носят нейтральный характер из-за того, что генетический дрейф становится в них основным по интенсивности популяционно-генетическим процессом. Для обнаружения регионов, ассоциированных с адаптацией кильдинской трески к особым условиям обитания, требуются дальнейшие исследования.

Стратегия сохранения кильдинской трески

Популяцию кильдинской трески важно сохранить как уникальную эволюционную систему, адаптированную к специфическим экстремальным условиям обитания и сохранить существующие паттерны внутри- и межпопуляционного разнообразия. Для сохранения кильдинской трески мы предлагаем следующие меры:

- 1) охранять её местообитание, озеро Могильное, и его водосборную зону от вредных воздействий человека (свалки мусора, слива жидких отходов, движения автотранспорта вблизи озера, вылова рыбы и т.п.),
- 2) запретить заселение в озеро Могильное рыб из других мест на любых стадиях развития (икра, малек, взрослые особи).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было изучено происхождение, демографическая история и нынешнее состояние популяции кильдинской трески, обитающей в меромиктическом озере Могильном (остров Кильдин, Баренцево море). Было установлено, что кильдинская треска произошла от мигрирующего экотипа баренцевоморской трески. Отделилась озерная треска от предковой морской популяции приблизительно 1800 лет назад (330 поколений), вероятно, в результате поднятия валунной перемычки между озером и Кильдинской салмой. Озерная треска репродуктивно полностью изолирована от морской популяции и генетически значительно дивергировала.

Показано, что в озере обитает всего несколько сотен особей взрослой трески. Эффективная численность озерной популяции – около 100, что на два порядка меньше, чем у баренцевоморской трески. Кильдинская треска характеризуется сниженным в 3-4 раза по сравнению с морской популяцией генетическим разнообразием по ядерным маркерам и, в отличие от морской популяции, отсутствием полиморфизма в маркерах мтДНК. Поскольку в недавнем прошлом не было детектировано резких сокращений численности данной популяции, то снижение генетического разнообразия, вероятно, связано с высоким уровнем генетического дрейфа при малой численности.

Уникальная популяция трески оз. Могильное (кильдинская треска) адаптирована к необычным условиям среды, обладает рядом морфологических, физиологических, поведенческих и генетических особенностей и является важным компонентом внутривидового разнообразия, требующим принятия мер по её сохранению.

ВЫВОДЫ

1. Полногеномное сравнение кильдинской трески (популяции атлантической трески озера Могильное на о. Кильдин, Баренцево море) со стационарным и мигрирующим экотипами морской атлантической трески и последующая проверка результатов индивидуальным генотипированием по разработанным нами SNP-тестам показали, что кильдинская треска мономорфна по хромосомным инверсиям LG2 и LG7, характерным для мигрирующего экотипа, что указывает на происхождение кильдинской трески

от мигрирующего экотипа; по инверсии LG1 она имеет оба аллеля, как и морская треска.

2. С помощью полногеномного секвенирования и микросателлитного анализа было оценено генетическое разнообразие кильдинской трески: в среднем по геному $\pi=0.0013$ ($sd=0.0025$), что в 3-4 раза меньше, чем генетическое разнообразие морской трески. Проведенный анализ не выявил у кильдинской трески локусов, находящихся под отбором: вероятнее всего, генетический дрейф в столь малой популяции доминирует над селективными процессами, так что популяционно-генетические процессы у кильдинской трески, в т.ч. редукция её генетического разнообразия, носят нейтральный характер.

3. Популяционно-генетический анализ микросателлитных данных показывает, что кильдинскую треску следует отнести к предельно малым природным популяциям (согласно пороговому правилу эффективных численностей 100/1000): медианная оценка её эффективной численности $N_e=107$, что на два порядка меньше, чем эффективная численность морской популяции атлантической трески; согласно нашему мнению, количество взрослых особей в озерной популяции – около 185 особей (95% доверительный интервал от 97 до 462 особей).

4. На основании моделирования и демографического анализа микросателлитной изменчивости было установлено, что популяция трески Могильное длительное время репродуктивно изолирована от морской популяции: медианная оценка времени дивергенции составляет приблизительно 330 поколений, или 1800 лет, что согласуется с геологической оценкой времени образования перемычки, отделяющей озеро Могильное от Баренцева моря.

5. Кильдинская треска – это уникальная озерная популяция, длительное время живущая в репродуктивной изоляции, адаптированная к экстремальным условиям обитания (резкие градиенты солёности и содержания кислорода, нехватка пищевых ресурсов, крайне ограниченный ареал обитания). Для её сохранения нужно запретить неконтролируемый отлов озерной трески, обеспечить сохранность озера Могильное и его водосборной площади, не допускать искусственного заселения озера морской треской.

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Zhivotovsky L.A. Effects of genetic drift in a small population of Atlantic cod (*Gadus morhua kildinensis* Derjugin) landlocked in a meromictic lake over hundreds of generations: Genetic variation and conservation measures / L.A. Zhivotovsky*, **A.A. Teterina***, N.V. Mukhina, A.N. Stroganov, G.A. Rubtsova, K.I. Afanasiev // Conservation Genetics. – 2016. – V. 17. – №1 – P. 229–238. * - равный вклад авторов.
2. Строганов А.Н. О комплексных экспедициях на озеро Могильное (остров Кильдин, Баренцево море) в 2011, 2012 годах / А.Н. Строганов, Н.В. Мухина, К.И. Афанасьев, К.С. Коткин, А.И. Никифоров, Г.А. Рубцова, **A.A. Тетерина**, Л.А. Животовский // Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2013. – № 3. – С. 86-90.

Работы, опубликованные в других изданиях

1. **Teterina A.A.** Genomic testing of landlocked Kildin cod (*Gadus morhua kildinensis*) for its ancestral state: stationary or migratory ecotype? / **A.A. Teterina**, L.A. Zhivotovsky // PeerJ Preprints. – 2016. – e2497v1.
2. **Тетерина А.А.** Популяционно-генетические процессы у трески *Gadus morhua kildinensis* реликтового озера Могильное/ **A.A. Тетерина**, Л.А. Животовский, А.Н. Строганов //Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии: тезисы докладов научной конференции (г. Ростов-на-Дону, 25–29 марта 2013 г.) /отв. ред.чл.-корр. РАН Д.Г. Матишов. – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. – С. 98.
3. **Тетерина А.А.** Популяционно-генетические процессы у кильдинской трески *Gadus morhua kildinensis* / **A.A. Тетерина**, Л.А. Животовский, А.А. Юрченко, А.Н. Строганов, Н.В. Мухина // Биология – Наука XXI века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 21 –26 апреля 2013 г.). – Сборник тезисов. – С. 230.