

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА  
Российской академии наук

*На правах рукописи*

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

03.02.07 – генетика

Диссертация  
на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
д.б.н., профессор Животовский Л. А.

Москва – 2016

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	12
1.1. Атлантическая треска.....	12
1.1.1. Жизненный цикл, биологические и генетические особенности.....	13
1.1.2. Озерные популяции трески.....	16
1.2. Озеро Могильное.....	21
1.2.1. Происхождение и возраст озера Могильное.....	21
1.2.2. Структура, гидрохимические и физические характеристики озера Могильное.....	22
1.2.3. Фауна озера Могильное.....	23
1.3. Биология кильдинской трески ( <i>Gadus morhua kildinensis</i> ).....	24
1.4. Генетическое разнообразие кильдинской трески.....	25
1.5. Популяционно-генетические параметры малых популяций.....	26
1.5.1. Эффективная и цenzусная численности популяции.....	26
1.5.2. Генетическая изменчивость и иерархическая структура популяций.....	27
1.5.3. Популяционно-генетические процессы в малых изолированных популяциях.....	28
1.5.3.1. Эффект основателя и бутылочное горлышко.....	28
1.5.3.2. Генетический дрейф и генетический груз.....	29
1.5.3.3. Отбор и адаптация .....	30

1.6. Заключение.....	31
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>32</b>
2.1. Сбор и хранение биологического материала.....	32
2.2. Молекулярно-генетические методы.....	33
2.2.1. Выделение геномной ДНК.....	33
2.2.2. Микросателлитный анализ.....	34
2.2.3. Амплификация и секвенирование фрагментов митохондриальной и ядерной ДНК.....	35
2.2.4. Полногеномное секвенирование кильдинской трески.....	37
2.3. Статистические методы анализа.....	38
2.3.1. Проверка селективной нейтральности маркеров.....	38
2.3.2. Анализ демографической истории и численности популяции.....	38
2.3.3. Дополнительные полногеномные данные.....	40
2.3.4. Анализ генетической дифференциации популяций.....	40
2.3.5. Анализ внутрипопуляционной изменчивости.....	42
2.3.6. Сравнение кильдинской трески с экотипами атлантической трески.....	44
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....</b>	<b>47</b>
3.1. Внутрипопуляционное разнообразие кильдинской трески.....	47
3.2. Поиск геномных регионов под отбором.....	48
3.3. Сравнение кильдинской трески с прибрежной и глубоководной треской.....	49

3.4. Оценка генетического груза.....	50
3.5. Сравнение кильдинской трески с экотипами атлантической трески.....	51
3.6. Оценка микросателлитного генетического разнообразия.....	54
3.7. Расположение в геноме и проверка нейтральности микросателлитных маркеров.....	56
3.8. Генетические различия между кильдинской и морской треской.....	59
3.9. Оценка численности кильдинской трески.....	63
3.10. Оценка эффективной численности.....	64
3.11. Оценка времени дивергенции озерной и морской трески.....	65
3.12. Демографическая история кильдинской трески.....	66
3.13. Анализ генетического разнообразия митохондриальной ДНК озерной и морской трески.....	68
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>70</b>
4.1. Происхождение кильдинской трески.....	70
4.2. Генетическая дивергенция озерной и морской трески.....	73
4.3. Популяционно-генетические характеристики кильдинской трески.....	75
4.4. Генетическое разнообразие озерной и морской трески.....	76
4.5. Поиск геномных регионов, находящихся под отбором у кильдинской трески.....	78
4.6. Инбредная депрессия и генетический груз.....	79
4.7. Стратегия сохранения кильдинской трески.....	79
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>82</b>

<b>ВЫВОДЫ</b> .....	83
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	85
<b>СПИСОК ТЕРМИНОВ</b> .....	86
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	87
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b> .....	108

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Атлантическая треска *Gadus morhua* играет ключевую роль в морских экосистемах Северо-Европейского бассейна и атлантического побережья Северной Америки (Бойцов и др., 2003). Кроме того, треска имеет особое социально-экономическое значение для прибрежного населения северных стран. Благодаря важному промысловому значению, атлантическая треска в настоящий момент является видом с достаточно хорошо изученной биологией, поведением и популяционно-генетической структурой. В 2011 году был секвенирован геном атлантической трески (Star *et al.*, 2011), что привело к большому количеству полногеномных исследований трески и работ по изучению адаптаций трески к особенностям ее обитания.

Атлантическая треска отличается пластичностью, способна обитать в различных условиях солености, температуры, глубин (Bradbury *et al.*, 2010, Berg *et al.*, 2015). У трески встречаются разные типы миграционного поведения: одни особи совершают протяженные нерестовые и пищевые миграции в глубоководные районы моря (мигрирующий экотип), другие особи не перемещаются на большие расстояния и остаются в мелководной прибрежной зоне (стационарный экотип) (Pampoulie *et al.*, 2008, Nordeide *et al.*, 2011). Между данными экотипами была показана генетическая дифференциация по трем геномным регионам, относящимся к трём разным группам сцепления и составляющим около 4% генома (Berg *et al.*, 2015, 2016).

Треска – морская рыба, однако у неё описано несколько изолированных популяций, населяющих солоноватые либо меромиктические прибрежные озера. Эти озера располагаются как в географических районах, которые входили в ареал вида в прошлом, так и в районах, которые атлантическая треска населяет в настоящее время (Харди и др., 2008). Одним из таких озер является меромиктическое озеро Могильное на острове Кильдин в Баренцевом море.

Кильдинская треска – эндемик озера Могильное, занесена в Красную книгу России с присвоением категории «исчезающие виды» (Шилин, 2001) и таксономически определена как *Gadus morhua kildinensis* (Дерюгин, 1920). Само озеро полностью изолировалось от Баренцева моря, согласно геологическим данным, от тысячи до двух тысяч лет назад. Кильдинская треска обитает в узком промежуточном соленом слое озера, запертая между верхним пресным и нижним ядовитым сероводородным слоем. Она отличается от морской трески морфологически, физиологически, поведенчески (Цееб, 1975а, 1975б, 1975в; Цееб, Поздняков, 1975; Новиков и др., 2006а). Однако ни происхождение данной популяции (от стационарного или мигрирующего экотипа), ни возраст, ни дальнейшая её эволюционная история не были известны. А это является ключевым моментом для понимания ее состояния в настоящее время.

**Степень разработанности темы исследования.** Озеро Могильное хорошо изучено с гидрологической, гидрохимической, геологической точки зрения. Достаточно полно описана, флора, фауна, а также микробиология данного водоема («Реликтовое озеро...» 2002). Кильдинская треска описана в 1920 году К.М. Дерюгиным (Дерюгин, 1920), в этой и последующих экспедициях была изучена ее морфология, экология, характер питания, образ жизни («Реликтовое озеро...» 1975, 2002). 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 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 экспедиций 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 особей 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. Также впервые проведено её полногеномное секвенирование и сравнение с мигрирующим и стационарным экотипами трески. Впервые оценены её популяционно-генетические параметры по большому набору генетических маркеров и по геному в целом. Впервые проанализирована генетико-демографическая история кильдинской трески: выявлен предковый экотип, даны оценки её эффективной и цензусной численностей и времени её дивергенции от морской предковой популяции.

**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. Также изучение кильдинской трески позволяет пролить свет на генетические процессы, происходящие в малых изолированных природных популяциях.

Важное практическое значение имеет оценка состояния этой краснокнижной популяции в настоящее время, чтобы, используя данные оценки, отслеживать динамику состояния кильдинской трески в будущем, так как при малой численности данная популяция уязвима и ее сохранение зависит не только от состояния ее места обитания, озера Могильное, но и генетических характеристик самой популяции.

В данном исследовании разработана панель локусов для всех трех основных геномных регионов дивергенции стационарного и мигрирующего экотипов трески (Berg *et al.*, 2016) и предложен алгоритм дальнейшего анализа, требующие существенно меньших временных и финансовых затрат, чем ранее предложенные методы идентификации экотипов трески, что позволит перейти к широким эколого-ихтиологическим исследованиям атлантической трески.

**Личный вклад автора.** Вклад автора заключается в организации экспедиции на остров Кильдин в 2012 году и сборе биологического материала, проведении молекулярно-генетического анализа, подборе дополнительной панели используемых микросателлитных локусов и 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, 2013г.), международных конференциях «Moscow Conference on Computational Molecular Biology» (г. Москва, 2015г.) и «Genome Evolution Conference» (Rehovot, Israel, 2016 г.). Материалы данной работы были представлены на сессиях аспирантов, а также на семинарах лаборатории генетических проблем идентификации ИОГен РАН в 2012-2015гг. Апробация работы проходила 29 сентября 2016 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН. По результатам данного исследования опубликовано 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 статья находится в печати, 1 на реценировании:

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)

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, **А.А. Тетерина**, Л.А. Животовский // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. – 2013. – № 3. – С. 86-90.

**Тетерина А.А.** Разработка маркеров для генетической идентификации экотипов атлантической трески *Gadus morhua* / А.А. Тетерина, Л.А. Животовский // Генетика – 2017 – (в печати).

**Teterina А.А.** Genomic testing of landlocked Kildin cod (*Gadus morhua kildinensis*) for its ancestral state: stationary or migratory ecotype? / А.А. Teterina, L.A. Zhivotovsky // PeerJ Preprints – 2016 – e2497v1.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Атлантическая треска

Атлантическая треска (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) – хищная морская придонная бентопелагическая рыба из семейства тресковых (*Gadidae*). Полная таксономическая классификация данного вида (по базе NCBI Taxonomy; Sayers *et al.*, 2009; Benson *et al.*, 2008): *Eukaryota*; *Opisthokonta*; *Metazoa*; *Eumetazoa*; *Bilateria*; *Deuterostomia*; *Chordata*; *Craniata*; *Vertebrata*; *Gnathostomata*; *Teleostomi*; *Euteleostomi*; *Actinopterygii*; *Actinopteri*; *Neopterygii*; *Teleostei*; *Osteoglossocephalai*; *Clupeocephala*; *Euteleosteomorpha*; *Neoteleostei*; *Eurypterygia*; *Ctenosquamata*; *Acanthomorphata*; *Paracanthomorphacea*; *Zeigadaria*; *Gadariae*; *Gadiformes*; *Gadoidei*; *Gadidae*; *Gadus morhua*. В настоящее время дополнительно таксономически выделяют три подвида атлантической трески: (1) балтийскую *Gadus morhua callarias* (Linnaeus, 1758), (2) беломорскую, *Gadus morhua marisalbi* (Derjugin, 1920 ) и (3) кильдинскую треску, *Gadus morhua kildinensis* (Derjugin, 1920).

Треска широко распространена в северной части Атлантического океана от мыса Хаттерас, Северная Каролина (35° с. ш.), на севере от оконечности Лабрадора, мыс Чидли (60° с. ш.), до западного побережья Гренландии и пролива Дэвиса (~ 73° с. ш.). На востоке ареал простирается еще дальше на север, достигая 75-й параллели (Харди и др., 2008), от западного побережья Гренландии, через Баренцево море, до западных берегов Новой Земли и юго-западной части Карского моря (Бойцов и др., 2003).

Треска является одной из наиболее важных промысловых рыб Северной Атлантики, добыча её ведется с 1400 года (Kurlansky, 1997) и, например, в Баренцевом море составляет несколько миллионов тонн в год (Бойцов и др., 2003). В течение последнего столетия в результате интенсивного вылова произошло резкое сокращение численности трески, изменившее размер и

структуру ее популяции (Caddy, Cochrane, 2001; Hutchings, 2000). Кроме того, промысел трески стал фактором отбора для популяции: получили заметное преимущество особи, которые успевали оставить потомство раньше, имея меньшие размеры и возраст, так с 1940х годов до 1990х средний возраст полового созревания трески Баренцева моря изменился с девяти до семи лет (Olsen *et al.*, 2004). Другим критическим фактором, вызывающим сокращение численности атлантической трески, является увеличение температуры вод в Мировом океане (Pershing *et al.*, 2015).

### **1.1.1. Жизненный цикл, биологические и генетические особенности трески**

Продолжительность жизни трески составляет до 25 лет (O'Brien *et al.*, 1993), взрослые особи достигают длины 1.8 м и веса до 40 кг (Световидов, 1948). Плодовитость трески увеличивается с годами (Marteinsdottir, Vegg, 2002), и в целом достаточно высока: самки могут откладывать миллион икринок в год (Salvanes *et al.*, 2004). По характеру питания треска вид-эврифаг, в спектр её питания входит более 200 видов организмов, из которых наибольшую часть составляют 20-25 видов (Бойцов и др., 2003). Атлантическая треска – активный хищник, предпочитающий подвижные организмы, в основном рыбу (Цееб, Астафьева 1975).

Жизненный цикл атлантической трески тесно связан с миграциями. Половозрелые особи трески мигрируют к нерестилищам против течения, после нереста они совершают миграции по течению к местам нагула. Икра и личинки пассивно дрейфуют в струях тех же течений к местам обитания молоди. Через некоторое время подросшая треска мигрирует из районов концентрации молоди к местам нагула (Harden 1968).

Уже более восьмидесяти лет известны две различные экологические формы атлантической трески: «мигрирующая» и «стационарная» (Rollefsen 1933; Nordeide *et al.*, 2011). Данные формы, или экотипы, были обнаружены на обеих

сторонах Атлантики: в Исландии, Гренландии, у берегов Скандинавского полуострова (Bradbury *et al.*, 2010; Grabowski *et al.*, 2011; Le Bris *et al.*, 2013; Halldorsdottir, Arnason 2015). В некоторых работах эти экологические формы относят к криптическим видам (Bradbury *et al.*, 2014). На восточной части ареалы мигрирующий и стационарный экотипы преобладают, соответственно, в группировке северо-восточной арктической трески (Northeast Arctic cod, NEAC) и норвежской прибрежной трески (Norwegian coastal cod, NCC) (Rollefsen 1933; Westgaard *et al.*, 2007).

Мигрирующий тип обитает на глубине нескольких сотен метров, совершает протяженные пищевые и нерестовые миграции от берегов Норвегии в Баренцево море, при питании может подниматься на сотни метров вверх. Стационарный экотип живет на небольшой глубине, как правило, менее ста метров, во фьордах Норвегии, и практически не покидает прибрежные области (Nordeide *et al.*, 2011). Между экотипами также обнаружены различия в количестве позвонков (Templeman 1981), скорости роста и полового созревания: стационарная форма быстрее растет и практически на один год быстрее созревает, чем мигрирующая (Berg, Albert 2003; Brander 1995). Также были показаны различия в условиях их обитания, мигрирующий тип обитает в условиях большей солености, более низкого содержания кислорода и более низкой температуры, чем стационарный экотип (Bradbury *et al.*, 2010).

Одним из первых маркеров, по которому была найдена генетическая дифференциация между этими экотипами, был локус *PanI* (пантофизин, Rogson, 2001), который далее активно использовался в исследованиях (Case *et al.*, 2005; Макеенко и др., 2014), в том числе как маркер для определения субпопуляционных структур. Было установлено, что полиморфизм в локусе *PanI* сильно ассоциирован с глубиной обитания и местом сбора материала, а не с исторической структурой популяции (Arnason *et al.*, 2009; Макеенко и др., 2014). Кроме того, было показано, что полиморфизм в *PanI* локусе связан со стационарным и мигрирующим типом поведения, а также вертикальным

пищевым поведением (Thorsteinsson *et al.*, 2012). У гибридов данных экотипов наблюдается промежуточный тип вертикального поведения (Pampoulie *et al.*, 2008).

В недавних работах между экотипами была обнаружена генетическая дифференциация и в «островках дивергенции» (islands of divergence), а именно в участках в группе сцепления LG1, LG2, LG7 и LG12 (Bradbury *et al.*, 2010, Sodeland *et al.*, 2016), далее по тексту так будут обозначаться именно «островки дивергенции», а не целые группы сцепления. Эти локусы представляют собой протяженные геномные инверсии (Kirubakaran *et al.*, 2016, Berg *et al.*, 2016), двойная инверсия в LG1 общей длиной 18.5 млн.н., инверсии в LG2, LG7, LG12, которые имеют размер 5, 9.5, 13 млн.н., соответственно (Berg *et al.*, 2015). Различия по частотам вариантов LG1 нашли только на восточной части ареала (Kirubakaran *et al.*, 2016, Berg *et al.*, 2016), а трех других регионов – по обе стороны Атлантики (Bradbury *et al.*, 2010). Все эти регионы показывают сильную корреляцию с условиями обитания трески (Bradbury *et al.*, 2010, Berg *et al.*, 2015) и тип миграционного поведения (Samuk, 2016). В группе сцепления LG1 расположен локус *PanI* (pantophysin), для которого была уже показана генетическая дифференциация экотипов ранее (Pogson, 2001). Регион LG1, вероятно, связан с адаптацией к особенностям энергетического метаболизма и жизни на глубине (Kirubakaran *et al.*, 2016). LG1 находится под сильным давлением направленного отбора только среди мигрирующего экотипа, для стационарного же этот регион является селективно нейтральным (Samuk 2016, Berg *et al.*, 2016). Было показано, что LG2 и LG7 ассоциированы с концентрацией кислорода и/или соленостью воды, и они имеют важное значение для дифференциации экотипов (Berg *et al.*, 2016). Последний же из четырех регионов, LG12 связывают с адаптацией к температурным условиям (Berg *et al.*, 2015), но недавние исследования показали, что этот регион, скорее всего, не имеет отношения к дифференциации мигрирующего и стационарного экотипов (Berg *et al.*, 2016). Стоит отметить, что между остальными регионами генома данных

экотипов не было найдено значимой генетической дифференциации (Eiriksson, Arnason, 2013; Karlsen et al., 2013).

### **1.1.2. Озерные популяции трески**

Различные субпопуляции трески приспособлены к различным условиям обитания, таким как градиенты солености, глубина и температура; все это делает атлантическую треску привлекательным организмом для изучения эволюции, естественного отбора и видообразования (Therkildsen *et al.*, 2010; Stroganov, 2015). Несмотря на то, что атлантическая треска является видом, обитающим в море, зафиксировано несколько случаев успешного существования изолированных или частично изолированных популяций в прибрежных соленых озерах (Харди и др., 2008).

В настоящее время, известно 8 случаев достоверного существования частично и полностью изолированных популяций трески в арктических соленых озерах (Харди и др., 2008): три канадских озера и по одному обнаруженному озеру в Гренландии, острове Сёрё (Норвегия), Новой Земле, Шпицбергене и острове Кильдин (рис. 1.1).

(1) Озеро Огак, Баффинова Земля, Канада. Небольшое (148 га) меромиктическое озеро, расположенное в отделившейся от моря части залива Фробишера (McLaren, 1967a). Примечательно, что в заливе Фробишера не отмечено ни одного случая поимки трески (McLaren, 1967b). Ближайшая точка, куда заходит треска в настоящее время, находится в 150 км от озера Огак (Kennedy, 1953). Огак – сильно стратифицированное озеро, верхний практически пресный слой доходит до глубины 5 м. После этой глубины соленость резко возрастает до 23 ‰, достигая величины 27 ‰ между 10м и 40м. Ниже 27 метров начинается бескислородная зона, богатая сероводородом (Dunbar, 1958). Несколько раз в год морские приливы превышают уровень озера, тем самым обеспечивая непосредственную кратковременную связь озера и моря (McLaren, 1967a).

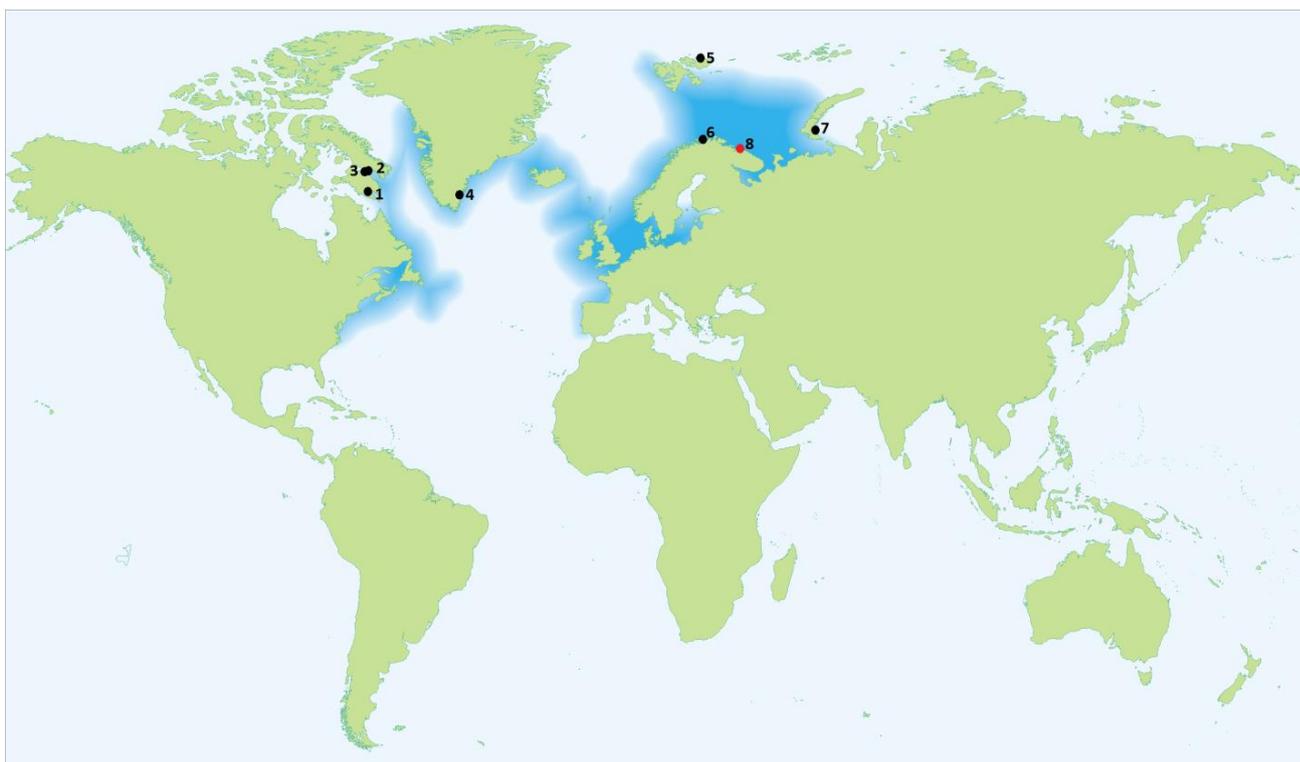


Рисунок 1.1 – Расположение озер, в которых была обнаружена атлантическая треска. Обозначения: синим цветом показан ареал атлантической трески, 1- озеро Огак, 2 – озеро Тариуярусик, 3 – озеро Квазигиалиминик, 4 – озеро в Гренландии, 5 – озеро Тошкеватнет, 6 – озеро острова Сёре, 7 – озеро на Новой Земле, 8 – озеро Могильное. Карта взята с <https://ru.wikipedia.org>, расположение озер по Харди и др., 2008.

Наличие атлантической трески в этом озере впервые зафиксировано в экспедиции Портера-Шоу в 1896-1897 гг (Porter 1898). Треска занимает средний слой озера, молодь питается науплиусами копепод (Patriquin, 1967). Основу питания взрослой трески составляют морские ежи, моллюски и полихеты, обитающие в этом озере, а также отмечен высокий уровень каннибализма (Харди и др., 2008; Hardie, Hutchings 2014). Треска данного озера имеет высокий темп роста, живет более 15 лет, а максимальный размер выловленной особи составил 157 см. (Харди 2008). Количество взрослых особей трески составляет несколько десятков тысяч (Patriquin, 1967).

(2) Озеро Тариуярусик, Баффинова Земля, Канада. Слабо стратифицированное озеро площадью 540 га. Глубина озера 80 метров, первый

слой глубиной около 3 метров имеет соленость 7‰, соленость морского слоя, располагающегося на глубине от 3 до 28 метров, составляет 23-27 ‰, с глубины 28 метров начинается бескислородный слой воды высокой солености. В течение года озеро захлестывает около 2-3 десятков приливов, высота которых превышает уровень дамбы, отделяющей озеро, и достигает 50 см. В бентосе озера отмечено обилие морских ежей. Треска немногочислена, составляет несколько тысяч взрослых особей, но попадаются довольно крупные экземпляры, более 1 м, как и в озере Огак отмечен высокий уровень каннибализма (Харди и др., 2008; Hardie, Hutchings 2014).

(3) Озеро Квазигалиминик, Баффинова Земля, Канада. Сильно стратифицированное озеро площадью 1000 га и глубиной 38 м. Верхние 3-5 метров приходятся на пресный слой, далее следует слой морской воды, после глубины 30 метров начинается гиперсоленая бескислородная зона. Во время максимальных приливов (около 70 раз с июня по ноябрь) озеро может непосредственно сообщаться с морем (высота прилива над уровнем плотины, отделяющей озеро, достигает 60 см). В остальное время морская вода попадает в озеро, проходя через плотину из гравия и булыжника. Местным рыбакам популяция трески в этом озере известна на протяжении нескольких поколений. В 2003 году Харди (Харди и др., 2008) подтвердил, что в озере действительно обитает *Gadus morhua*.

Треска из трех данных канадских озер (Огак, Тариурусик, Квазигалиминик) имела действительную численность в несколько тысяч взрослых особей; эффективную численность около тысячи особей; сниженное по сравнению с прибрежной морской треской среднее аллельное разнообразие (соответственно, в 2.6, 3.1 и 2.1 раза) по сравнению с морской треской; достаточно высокую гетерозиготность (соответственно, 0.6, 0.6 и 0.7), а время колонизации озер оценивалось от 3000 до 8000 лет (Hardie 2006).

(4) Безымянное озеро в Гренландии. В 1996 году несколько особей атлантической трески были выловлены в гренландском озере, неподалеку от

фьорда Тиммиармиут (Timmiarmiutfjord). Гидрография озера не изучена, хотя известно, что озеро соединяется с морем во время приливов. По сообщениям от местного населения, треска обитает и нерестится в озере постоянно. По крайней мере, первый облов озера в 1950 году показал наличие трески (Харди и др., 2008).

(5) Озеро Тошкеватнет (Torskevatnet, Torsk- треска, vatnet-озеро), о. Северо-Восточная Земля, Шпицберген. Меромиктическое озеро, глубиной 35-40 метров, верхний солоноватоводный слой занимает 11-12 м и богат кислородом, ниже располагается бескислородный слой с соленостью 50-52 ‰, насыщенный сероводородом (Gulliksen, Svensen 2004). В данном озере обнаружена треска и атлантический голец. Были свидетельства периодического выхода данной трески в опресненный слой. Также важно отметить, что в прибрежных водах рядом с озером треска не водится, поэтому рассматривается гипотеза приноса в данное озеро трески в виде икры через высокие приливы (Харди и др., 2008).

(6) Озеро на острове Сёре (Норвегия). Треска обитает в небольшом меромиктическом озере, состоящем из трех слоев: пресного, солоноватого (10-15 ‰) и бескислородного соленого (30 ‰). Озеро непосредственно сообщается с морем в краткосрочные периоды пиковых весенних приливов, примерно дважды в год. В солоноватом слое озера было поймано несколько незрелых особей трески и сайды (Харди и др., 2008).

(7) Популяция трески на Новой Земле. Озеро находится на юго-восточной оконечности Новой Земли близ бухты Кротова. Это местообитание расположено за пределами ареала вида. Атлантическая треска могла проникнуть сюда в самые теплые годы, пройдя пролив Карские ворота. Считается (Харди и др., 2008), что треска зашла в солоноватое озеро, избегая отрицательных температур Карского моря, и оказалась запертой в озере, отделившимся от моря отмелью из булыжника во время штормов с сильными северо-восточными и восточными ветрами, преобладающими в этом регионе в конце лета. Озерная треска была обнаружена здесь в ходе русской экспедиции 1939-1940 гг. Участниками экспедиции было выловлено около 300 особей трески для пропитания (Пономаренко 1994). В

настоящий момент судьба данной популяции неизвестна, т.к. треска могла не пережить экстремально холодную зиму 1940-1941гг. (Харди и др., 2008).

(8) Популяция трески озера Могильное (о. Кильдин, Баренцево море), о которой подробнее будет написано далее и изучению которой посвящена данная работа. Оно отличается от остальных озер тем, что у него нет свободного притока морской воды за счет высоких приливов, морская вода поступает через естественную каменную дамбу фильтрацией («Реликтовое озеро...» 2002).

Суммируя сказанное выше, в некоторых случаях треска образует устойчивые изолированные или полуизолированные популяции. Во всех озерах есть слой воды, в котором в основном обитает и, видимо, размножается треска, все озера находятся на береговой линии и обладают выраженной стратификацией вод. Интересной задачей является изучение эволюционных и экологических последствий длительной изоляции для трески, а также истории колонизации данных водоемов. Только озеро на о. Сёре и о. Кильдин находятся в границе современного обитания вида (Харди и др., 2008).

## **1.2. Озеро Могильное**

Реликтовое озеро Могильное располагается в юго-восточной части острова Кильдин у Кольского полуострова в Баренцевом море. От материка остров отделяет узкий пролив – Кильдинская салма. От пролива озеро Могильное отделено естественной перемычкой шириной 60-70м. Высота перемычки на 3 метра превышает уровень весеннего половодья (Дерюгин 1925). Плотина состоит из валунов, гальки и песка, через нее осуществляется инфильтрация воды на глубине 5-8 метров ниже поверхности озера (рис. 1.2, «Реликтовое озеро....» 2002).

### 1.2.1. Происхождение и возраст озера Могильное

Вследствие изоляции фауны озера Могильное, исследователей всегда интересовало, насколько давно озеро отделилось от моря. Согласно основной гипотезе, озеро Могильное является реликтовым, появилось в позднем голоцене из небольшого морского залива, вследствие тектонического и/или изостатического подъема земной коры. Плотина, отделяющая озеро от моря, была сформирована приливными наносами (Mityaev *et al.*, 2008).

По данным радиоуглеродного анализа проб донных отложений, около 3.5 тысяч лет назад озеро Могильное представляло собой губу, соединяющуюся с Кильдинской салмой (Гуревич, Лийва 1975). Исследования ископаемой фауны моллюсков (Галкин 1973) подтверждают эти данные. В течение 1500 лет в депрессии существовало озеро, в котором произрастали водоросли и имелся сероводородный слой. Около 2000 лет назад вследствие геологических процессов озеро прекратило свое существование, вновь соединившись с морем.



Рисунок 1.2 – Озеро Могильное на о. Кильдин. На фотографии видна дамба, отделяющая озеро от Кильдинского пролива (Кильдинской салмы). Фото Животовского Л.А.

В начале новой эры, депрессия существовала в виде полузамкнутой морской лагуны на протяжении нескольких веков. Согласно современным представлениям, озеро вновь отделилось от моря в конце первого - начале второго тысячелетия н.э. (Гуревич, Лийва 1975). Если экстраполировать данные по подъёму побережья Баренцева моря (Победоносцев, Розанов 1971) в прошлое, то возраст современного озера Могильное составит порядка 1000 лет.

### **1.2.2. Структура, гидрохимические и физические характеристики озера Могильное**

Озеро Могильное представляет собой меромиктический сильно стратифицированный водоем, площадью 0.11 км<sup>2</sup> и глубиной около 16 метров («Реликтовое озеро...» 2002). Н.М. Книповичем (Knipowitsch, 1895 - цит.по: Дерюгин, 1925) выделено 3 озерных слоя, к которым приурочено 3 биологические зоны. Верхний слой озера от поверхности до глубин около 4.5 – 6.5 м сильно опреснен, преобладающее население составляет пресноводная фауна. Средняя зона озера находится на глубинах от 4.5 – 6.5м до 11 – 13 м. Вода в этом слое имеет морскую соленость (10-30‰), слой населен морской биотой. На глубине 8-9 метров располагается так называемый «розовый слой», его цвет обусловлен скоплением окрашенных серобактерий, окисляющих сероводород до молекулярной серы. Нижний слой (от 11-13 метров до дна) содержит еще более соленую воду, насыщенную сероводородом, в этом слое обитают только анаэробные бактерии.

Верхняя часть пресноводного слоя зимой замерзает, весной и осенью в нем происходит активное перемешивание воды. Температура морского слоя практически не меняется в течение всего года и колеблется в пределах 5-9°C. (Дерюгин, 1925; Ретовский, 1933, «Реликтовое озеро...» 2002).

Содержание кислорода в морском слое колеблется в течение года от 1 до 7,5 см<sup>3</sup>/л (в среднем 20 – 70 % насыщения). Пресный слой более богат кислородом –

его насыщенность может превышать 100%. На глубине 10м содержание кислорода обычно не превышает 1 см<sup>3</sup>/л. («Реликтовое озеро...» 2002).

Озеро отделено от моря перемычкой, шириной 60-70м, представляющей собой нагромождение валунов, гальки и песка. Питание озера происходит как пресными, так и солеными водами. Пресная вода попадает в озеро с осадками и талыми водами, кроме того, пресная вода поступает из грунтового водоносного горизонта. На северном берегу озера находится несколько источников, наиболее крупный из которых находится на расстоянии 1,5-2,5 метра от уреза воды (Гуревич, 1975). Морская вода поступает в озеро, фильтруясь через перемычку между озером и Кильдинской салмой. Через эту же перемычку осуществляется инфильтрация озера на глубинах 5-8 метров. Высота перемычки достаточна, чтобы полностью исключить переливание через нее морской воды даже во время максимальных приливов (Харди и др., 2008), однако вместе с соленой водой в озеро попадают и некоторые планктонные организмы (Strelkov *et al.*, 2014).

### 1.2.3. Фауна озера Могильное

Фауна озера Могильное достаточно бедна. Зоопланктон насчитывает около 50 видов организмов, наиболее массово представлены коловратки (*Synchaeta sp.*, *Keratella quadrata*), копеподы (*Idyaea furcata*, *Centropages hamatus*) клadoцеры (*Podon leuckarti*, *Daphnia pulex*), личинки полихеты (*Polydora sp.*), а также личинки хирономид (*Chironomidae*). В бентосе преобладают бокоплавыв (*Gammarus duebeni*), изоподы (*Jaera marina*) и асцидии (*Ascidia varia*) («Реликтовое озеро...» 2002). В озере обитают актинии (*Metridium senile*), полихеты (*Pseudopotamilla reniformis*), мидии (*Mytilus edulis*) и арктические медузы (*Rathkea octopunctata*, *Cyanea arctica*) (Strelkov *et al.*, 2014). Ихтиофауна озера представлена тремя видами рыб: кильдинской треской (*Gadus morhua kildinensis*), маслюком (*Pholis gunnellus*) и трехиглой колюшкой (*Gasterosteus aculeatus*) («Реликтовое озеро...» 2002).

### 1.3. Биология кильдинской трески (*Gadus morhua kildinensis*)

Кильдинская треска является эндемиком меромиктического озера Могильное на острове Кильдин. Данная треска обладает рядом морфологических и биологических особенностей, обусловленных специфичностью места обитания. Популяция достаточно малочисленна и занесена в Красную книгу России (Шилин, 2001). Кильдинская треска, как и треска из других меромиктических озер обитает в среднем, соленом слое озера, который по вертикали составляет всего 4-5 метров (Цееб, 1975а). Однако по нашим наблюдениям и наблюдениям других исследователей (Цееб, 1975в) треска может кратковременно подниматься в верхний пресный слой озера, также способность кильдинской трески находиться в пресной воде проверялась экспериментально (Цееб, 1975а). У кильдинской трески, как и у морской атлантической трески, пелагическая икра, нерест происходит порционно с марта по июль. Икра находится на строго определенном уровне на глубине 7-7.5м, за полметра до ядовитого сероводородного слоя, при солености 26-28% (Цееб, Поздняков, 1975).

В первые несколько лет жизни у кильдинской трески достаточно высокий темп роста (Цееб, 1975а, Строганов и др., 2015), вероятно это связано с большим количеством кормовых ракообразных (дафнии, гаммарус) и каннибализмом (Hardie, Hutchings, 2015; Мухина и др., 2002). Старшие возрастные группы практически полностью переходят на гаммаруса. Отсутствие разнообразных и подходящих кормов для старшей трески (кроме ракообразных и собственной молоди) вызывает физическое истощение у взрослых рыб и снижение продолжительности жизни до 7-9 лет (Цееб, 1975в). Харди выдвинул гипотезу, что кильдинская треска изолирована около 10000 лет (Харди и др., 2008) предполагая, что треска находилась в озере задолго до поднятия перегородки между Кильдинской салмой и озером Могильное 1000-2000 лет назад. Однако данная гипотеза не была подтверждена экспериментальными данными.

#### 1.4. Генетическое разнообразие кильдинской трески

Несмотря на достаточно подробно изученную биологию кильдинской трески, на момент начала данного исследования почти не было сведений о её генетической изменчивости. Большая часть анализов была проведена на нескольких аллозимных локусах (Новиков и др., 2006а), по которым изменчивость кильдинской трески незначительно отличалась от морской трески, хотя в некоторых аллозимных локусах (например, PGI-1) частоты аллелей озерной трески отличались от частот морской (Новиков и др., 2002). Кроме того, были исследованы 4 особи трески по локусу *PanI*, три из них были гомозиготны по стационарному варианту и одна гетерозиготна (Fevolden *et al.*, 2012), из чего можно было бы заключить, что кильдинская треска произошла от прибрежного, стационарного экотипа, что было бы естественно предполагать ввиду непосредственной близости острова к матерiku. Также коллегами, сотрудниками лаборатории Проблем генетической идентификации ИОГен РАН и кафедры ихтиологии Биофака МГУ им. М.В. Ломоносова, был проведен первичный анализ 15 особей из озера Могильное по 8-ми микросателлитным локусам (Строганов и др., 2011), была показана сильно сниженная изменчивость данных локусов у озерной трески по сравнению с морской. Эта выборка была использована в этой работе и данные по ней были уточнены. Таким образом, сведения о генетической изменчивости кильдинской трески носили фрагментарный характер и нуждались в дальнейшем исследовании.

Следующие факторы могут способствовать длительному сохранению озерных популяций трески (Hardie, Hutching, 2011): 1) стабильные условия среды для развития икры и личинок (комфортный температурный режим, отсутствие течений и штормов); 2) отсутствие факторов, мешающих прохождению нереста; 3) отсутствие либо небольшое количество хищников, которые поедают икру и личинок. В целом это может обеспечивать достаточно большой репродуктивный успех, т.к. самые ранние стадии развития являются наибольшими источниками смертности у рыб (Swain, Sinclair, 2000; Walters, Kitchell, 2001).

## 1.5. Популяционно-генетические параметры малых популяций

### 1.5.1. Эффективная и ценозусная численности популяции

Эффективная численность, или эффективный размер, популяции – это генетический параметр популяции, определяется как численность идеальной панмиксной популяции, в которой процессы генетического дрейфа шли бы с такой же скоростью, как и в изучаемой популяции. Эффективная численность зависит от разных популяционных параметров, в первую очередь – от дисперсии числа половозрелых потомков у разных особей; как правило, она меньше фактической (цензусной) численности половозрелых особей (Wright, 1938).

Для природоохранных и других популяционных исследований важно оценить эффективный размер популяции достаточный для длительного сохранения популяции – минимальный жизнеспособный размер популяции (Soule, Franklin, 1980). Критическим микроэволюционным процессом в изолированных небольших популяциях является инбредная депрессия – увеличение доли гомозигот, в том числе по вредным и слабовредным аллелям, вследствие близкородственных скрещиваний, всегда имеющим место даже в панмиксных, но небольших по численности популяциях. Считается, чтобы популяция могла избежать таких негативных процессов как инбредная депрессия, и сохраниться в течение хотя бы пяти поколений, ее эффективная численность должна быть более 100 особей, а для сохранения разнообразия и эволюционного потенциала в течение длительного времени этот порог на порядок выше – 1000 особей (Frankham *et al.*, 2014).

Другим важным параметром, критичным для изолированных и полуизолированных популяций, является соотношение эффективной численности популяции ( $N_e$ ) и её ценозусной численности – фактического количества взрослых особей ( $N_c$ ). Показатель  $N_e/N_c$  отражает популяционную структуру и для малых популяций данное соотношение может быть достаточно большим, от 0.1 до 0.2 (Frankham *et al.*, 2014). Факторами, которые могут быть связаны с повышением

даного показателя это высокий средний уровень репродуктивного успеха и/или низкая изменчивость репродуктивного успеха (Hardie, Hutchings 2011; Lande, Barrowclough 1987). Например, атлантическая треска образует различные субпопуляции, в полуизолированных фьордовых популяциях эффективная численность составляет несколько тысяч особей при сотнях тысяч взрослых особей (Knutsen et al., 2011), а в канадских озерных популяциях трески численность трески может достигать нескольких тысяч при эффективной численности около тысячи (Hardie, Hutchings 2011). В морских же популяциях соотношение  $N_e/N_c$  намного меньше – от  $10^{-2}$  до  $10^{-5}$  (Hutchinson et al., 2003), т.е. эффективная численность отличается от цензусной численности на несколько порядков.  $N_e/N_c$  помогает в определении статуса популяции, необходимости принятия охранных и регулирующих мер, оно определяет чувствительность популяции к инбредной депрессии, потере разнообразия и резким колебаниям численности популяции (Soule 1987; Frankham et al., 2003; Palstra, Fraser 2012).

### **1.5.2. Генетическая изменчивость и иерархическая структура популяций**

Стабильность во времени и пространственная структура популяции являются важными характеристиками для понимания биологии вида (Hardie, Hutchings 2011). В пресноводных системах естественными барьерами, которые ограничивают миграции в популяциях и обеспечивают большую генетическую подразделенность между субпопуляциями, часто являются реки и озера. В морских же системах часто можно наблюдать меньшую структурированность популяции из-за более интенсивных генных потоков и перемешивания субпопуляций и, как следствие, меньшую генетическую дифференциацию (Ward et al., 1994). Более того, такие факторы как естественный отбор, история и демография популяций могут влиять на мутационно-дрейфовое равновесие, равновесие между случайными процессами (генетическим дрейфом) и генным потоком, вызывая трудности при интерпретации аллельных частот у морских

организмов (Hilbish, 1996). Генетические эффекты изоляции для популяций малых размеров недостаточно изучены для большей части морских организмов. И эта проблема важна из-за сокращения численности некоторых промысловых видов в результате активной добычи, из-з чего могут образовываться географически подразделенные группировки (Hardie, Hutchings 2011). Например, атлантическая треска в северо-восточной Атлантике, у которой после интенсивного многолетнего вылова резко сократились размеры стад, до сих пор не восстановила первоначальную численность, несмотря на последовавшее снижение уровня добычи (Hutchings, Reynolds, 2004).

### **1.5.3. Популяционно-генетические процессы в малых изолированных популяциях**

Существует несколько процессов, которые влияют на разнообразие и частоты аллелей в малых изолированных популяциях (Franklin, 1980): случайные (мутации, генетический дрейф и его разновидности: эффект основателя, бутылочное горлышко) и направленные изменения (естественный отбор).

#### **1.5.3.1. Эффект основателя и бутылочное горлышко**

Поскольку часто небольшие изолированные группировки особей происходят от нескольких индивидуумов, то наблюдается «эффект основателя» (*founder effect*), в результате которого генетическое разнообразие и частоты аллелей в такой популяции связаны с генотипами той небольшой группы особей (основателей), которая первоначально образовала эту популяцию (Templeton 1980). Аналогичный эффект наблюдается при резких или даже критических колебаниях численности популяции, тогда после восстановления численности преобладают потомки небольшого числа особей переживших неблагоприятный период; данный процесс называют прохождением популяцией «бутылочного горлышка» (*bottleneck effect*). В результате таких событий могут не только значительно меняться частоты аллелей, но и происходить их быстрая утрата, или, наоборот, увеличение частоты редкого аллеля (Nei, 1975).

### 1.5.3.2. Генетический дрейф и генетический груз

Большая часть вновь возникающих мутаций являются селективно нейтральными либо несут с собой слабовредящий эффект (Nei *et al.*, 2010, Eyre-Walker, Keightley, 2007). Поэтому накопление мутаций вызывает общее снижение приспособленности особей популяции по сравнению с наиболее приспособленным генотипом и называется генетическим грузом (Kimura *et al.*, 1963; Kimura, Maruyama, 1966; Agrawal, 2012). Генетический груз может возникать также при стабилизирующем отборе вследствие меньшей приспособленности гомозигот в сравнении с гетерозиготами (Kimura *et al.*, 1963).

В малых популяциях генетический дрейф, приводя к случайному увеличению вредных мутаций, тоже может вносить генетический груз (Kimura *et al.*, 1963), в них величина генетического груза могут быть значительно больше, чем в больших популяциях, поскольку частоты генов подвержены случайным колебаниям и мутационный груз становится случайной величиной. Также в малых популяциях бóльшую мутационную нагрузку могут наносить средневредные мутации, чем сильно вредные, поскольку последние могут находиться под сильным отрицательным отбором и устраняться из популяции, а слабовредные аллели могут надолго остаться в популяции (Kimura *et al.*, 1963). В результате большого генетического груза и снижения приспособленности до критического уровня в малых популяциях может наступить мутационное вырождение (*mutational meltdown*): резкое сокращение численности и вымирание (Zeyl *et al.*, 2001; Lynch, Gabriel, 1990). Дополнительным фактором может служить отсутствие рекомбинации в малых популяции при фиксации вредного варианта (Lynch *et al.*, 1995). Тем не менее, недавно было показано, что малые популяции не непрерывно снижают приспособленность, а только до момента достижения баланса дрейфа и отбора, когда фиксация полезных мутаций противодействует фиксации слабовредных мутаций (Poon, Otto 2000; Silander 2007; Gabriel, Burger, 1992). Также генетический дрейф в малых популяциях способствует снижению разнообразия, скорость его потери, взяв за меру разнообразия гетерозиготность,

зависит от эффективного размера популяции и ее можно описать следующим образом (Kliman *et al.*, 2008):

$$H_t = (1 - 1/2N_e)^t H_0 ,$$

где  $t$  – количество поколений,  $H_t$  – гетерозиготность через  $t$  поколений,  $N_e$  – эффективная численность,  $H_0$  – наблюдаемая гетерозиготность. Таким образом, чем меньше размер популяции, тем быстрее происходит потеря аллельного разнообразия.

### 1.5.3.3. Отбор и адаптация

В малых популяциях преобладают нейтральные процессы; аллель должен обладать очень сильным селективным преимуществом, чтобы начал действовать отбор (коэффициент отбора  $s \gg 1/N_e$ ) (Fisher 1930). При этом демографически изолированные популяции, которые обитают в нетипичных для вида местах, могут быть подвержены сильному отбору, так как они приспосабливаются к новой среде (Losos, Ricklefs 2009; Pergams, Lawler 2009). Это часто приводит к развитию новых фенотипов, что делает репродуктивно изолированные популяции полезной моделью для изучения эволюции (Losos *et al.*, 2001; Reznick, Bryga 1987).

Однако малые популяции потенциально имеют пониженную способность адаптироваться к новым изменениям окружающей среды (Arnold *et al.*, 2001) по двум причинам. Во-первых, из-за того что генетическая изменчивость и потенциальный ответ на отбор положительно коррелируют с численностью популяции. А во-вторых, особи малых популяций часто имеют сниженную жизнеспособность из-за варьирующих условий среды, а также инбредной депрессии и мутационного груза (Willi *et al.*, 2006). Именно поэтому для поддержки численности малых популяций важным условием является сохранение их местообитания.

## 1.6. Заключение

Кильдинская треска является одной из нескольких необычных изолированных популяций атлантической трески, она таксономически определена как подвид и обитает в экстремальных условиях, в резких градиентах содержания кислорода и солености, в условиях крайне ограниченного пространства и обедненной кормовой базы. Несмотря на изученность нескольких других озерных популяций и наличие некоторых генетических сведений о кильдинской треске, оставались открытыми многие вопросы относительно данной популяции: не было определено генетическое состояние, основные популяционные параметры и её демографическая история; также оставался открытым и вопрос о времени репродуктивной изоляции кильдинской популяции и о её происхождении. В данной работе с помощью молекулярно-генетических и статистических методов, о которых рассказано в следующей главе, были получены новые сведения о кильдинской треске и ответы на все поставленные выше вопросы.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Сбор и хранение биологического материала

В работе были использованы выборки *Gadus morhua*, собранные в различных экспедициях сотрудниками Лаборатории генетических проблем идентификации ИОГен РАН, сотрудниками ПИНРО и МГУ. Количество особей, время и место взятия проб указано в таблице 2.1. После поимки рыб отрезался небольшой фрагмент спинного плавника и фиксировался в 96% этаноле для дальнейшего анализа. После экспедиций образцы хранились в холодильниках при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Таблица 2.1 – Некоторые характеристики исходного материала.

№	Обозначение	Место взятия проб	Координаты	Год сбора	Кол-во, шт.
1	MOG00	оз. Могильное	69° 19' с.ш. 34° 20' в.д.	2000	15
2	MOG11	оз. Могильное	69° 19' с.ш. 34° 20' в.д.	2011	37
3	MOG12	оз. Могильное	69° 19' с.ш. 34° 20' в.д.	2012	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

Треска озера Могильное (рис. 2.1) занесена в Красную книгу Российской Федерации, поэтому вылов и сбор материала осуществлялся с разрешения Росприроднадзора, выданного в 2011-2012гг. по запросу ИОГен (№ 40 от 4 мая 2011г. и №44 от 19 апреля 2012г.). Ловля рыбы проводилась с помощью спиннинга с одиночным крючком со спиленной бородкой. После поимки, взвешивания и измерения длины туловища все особи кильдинской трески были возвращены в водоем. Автор работы принимала непосредственное участие в организации экспедиции на остров Кильдин в 2012 году и сборе материала.



Рисунок 2.1 – Кильдинская треска. Фотография Тетериной А.А, 20 июля 2012.

## **2.2. Молекулярно-генетические методы**

### **2.2.1. Выделение геномной ДНК**

Тотальную ДНК выделяли из небольшого фрагмента плавника с помощью реагентов Diatom DNA Prep 200 («Лаборатория ИзоГен» Россия), с помощью лизирующего раствора, сорбента и спиртового раствора, точно следуя протоколу набора. Выделенная ДНК далее хранилась при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.2. Микросателлитный анализ

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*. Все маркеры получены из литературных источников. Восемь маркеров (*Gmo3*, *Gmo8*, *Gmo19*, *Gmo34*, *Gmo35*, *Gmo-G12*, *Gmo-G18*, *PGmo32*) были использованы в работе по кильдинской треске, предшествующей данному исследованию (Строганов и др., 2011). Последовательности праймеров и другая информация о них приведена в таблице 2.2. ПЦР проводилась с помощью готовых наборов GenePakPCR Core («Лаборатория ИзоГен» Россия). К реагентам данного набора добавляли 5 мкл смеси прямого и обратного праймеров (концентрация каждого по 0.5 мкМ) и 5 мкл ДНК образца. Первым этапом амплификации была денатурация в течение 1 мин. при 95°C; вторым этапом – 33 цикла, включающих 30 с. денатурации ДНК при температуре 95°C, 30 с. отжига праймеров при оптимальной температуре для каждой пары (таблица 2.2) и элонгацию (достройку) цепей в течение 1 мин при 72°C; последним этапом была финальная элонгация 10 мин при 72°C.

Продукты амплификации разделялись на вертикальном полиакриламидном геле (0.5x TBE буфер, pH=8, 300 V, 2-4 часа). Для определения размера полученных фрагментов использовали ДНК плазмиды pVt322 после обработки рестриктазой *NotI* или *HpaII*. Полученные электрофореграммы визуализировались в ультрафиолетовом свете после окрашивания в бромистом этидии (5 мкг/мл, 5-10 мин.) и фотографировались с помощью прибора 1D Image Analysis Software.

При возникновении неоднозначности в трактовке аллелей какого-либо образца проводился повторный электрофорез, в котором в соседние лунки с перепроверяемым образцом добавлялись образцы с известными аллельными вариантами.

### 2.2.3. Амплификация и секвенирование фрагментов митохондриальной и ядерной ДНК

Для изучения полиморфизма митохондриальной ДНК кильдинской трески было выбрано два участка мтДНК: фрагмент «*ND2/tRNA-Trp/tRNA-Ala*» длиной 631 нуклеотид, кодирующий участок гена NADH дегидрогеназы субъединицы 2 (*ND2*), тРНК трипрофана (*tRNA-Trp*) и тРНК аланина (*tRNA-Ala*), и фрагмент гена цитохром оксидазы b (*cytb*) длиной 879 п.н. Первый фрагмент был выбран на основе анализа литературных данных (Marshall *et al.*, 2009) как наиболее вариабельный у тресковых рыб, а второй участок как менее изменчивый, но традиционно используемый в исследованиях.

Амплификация проводилась на программе аналогичной программе для микросателитных маркеров. Последовательности праймеров и оптимальная температура отжига указаны в таблице 2.2. Для проверки качества амплифицированной ДНК 3 мкл пробы наносили на 0.7% агарозный гель (SeaKem LE Agarose, Lonza, USA). Гель-электрофорез проводили в 0.5-кратном трис-боратном буфере (45 mM Трис-бората и 1 mM ЭДТА, pH=8.3) при постоянном напряжении 120 V в течение 40 минут. Фрагменты ДНК в геле окрашивали этидиумбромидом и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения размера фрагментов (молекулярной массы) использовали набор фрагментов ДНК, кратных 1000 п.н. (Сибэнзим, Россия).

Очистка продуктов ПЦР от примесей проводилась методом прямого переосаждения ДНК в мягких условиях с помощью этанола и ацетата аммония по протоколу, предложенному ЦКП «Геном» ([http://www.genome-centre.ru/downloads/NH4Ac\\_EtOH.pdf](http://www.genome-centre.ru/downloads/NH4Ac_EtOH.pdf)). Секвенирование фрагментов митохондриальной ДНК (мтДНК) и ядерных локусов *PanI*, *PACSIN3*, *AQP11* по Сэнгеру проводилось с помощью прямого праймера в компании «Синтол».

Таблица 2.2. –Пары праймеров для ядерных и митохондриальных локусов.

Название локуса	Последовательность праймера (5'–3')	Ta (°C)	Источник
<i>Gmo3</i>	F: AGGCACGCAGGTGGACAGGAAC R: GCAGCACGAGAGAGCTATTCCTC	50	Miller <i>et al.</i> , 2000
<i>Gmo8</i>	F: GCAAAAACGAGATGCACAGACACC R: TGGGGGAGGCATCTGTCAATCA	54	Miller <i>et al.</i> , 2000
<i>Gmo19</i>	F: CACAGTGAAGTGAACCCACTG R: GTCTTGCCTGTAAGTCAGCTTG	54	Miller <i>et al.</i> , 2000
<i>Gmo34</i>	F: TCCACAGAAGGTCTCCTAA R: GGTTGGACCTCATGGTGAA	45	Miller <i>et al.</i> , 2000
<i>Gmo35</i>	F: GGAGGTGCTTTGAAGATG R: CCTTATCATGTACGTTGTAAAC	50	Miller <i>et al.</i> , 2000
<i>PGmo71</i>	F: TGCACCCTGTTACCAAACAC R: ATTCAAAGTGTGTCTTTTGTGTGTCTG	62	Skirnisdottir <i>et al.</i> , 2008
<i>PGmo95</i>	F: GGGAGCAGGAGTCCTTCAC R: GTCACTGCTCACTCCTAGGG	62	Skirnisdottir <i>et al.</i> , 2008
<i>PGmo104</i>	F: AGTAATTTACCCTGAAACAACAAC R: CAAGACACACACGGGACTG	56	Skirnisdottir <i>et al.</i> , 2008
<i>Gmo-G12</i>	F: ATAACACTATTGCATTCCCTGTGT R:GTTTCTTTCAGCGGAATTAGCAACTTAAAGA	45	Wesmajervi <i>et al.</i> , 2007
<i>Gmo-G18</i>	F: ACAGCAGGTAATGAGACAAGCAGA R: GTTTCTTCTTAGTCTCGTTTGACCACACCTG	58	Wesmajervi <i>et al.</i> , 2007
<i>Gmo-C172</i>	F: TCATCGCCACATCCCACCTTGAAC R:GTTTCTTTCAGTGAGTTACGGATACCGAGAG	66	Delghandi <i>et al.</i> , 2008

## Продолжение таблицы 2.2

<i>Gmo-C193</i>	F: TAGGTCCGACATCACTTCCTGTCT R: GTTTCTTGACTGATCCAGTGTGAAGTGATGC	56	Delghandi <i>et al.</i> , 2008
<i>PGmo32</i>	F: CAATCGCCGTCCAACCAAC R: GGCGGCAGCAACGATTCTC	45	Jakobsdottir <i>et al.</i> , 2006
<i>Gmo-C20</i>	F: CTGCCAAAGCCTGTGACG R: GATGGTGGTGTGATTGTGGTTGT	62	Stenvik <i>et al.</i> , 2006
<i>GmoUCC-11</i>	F: CGGAGGTTATTTGGGATTT R: CAGGCTGCATCAGAACAAC	50	Carlsson <i>et al.</i> , 2013
<i>Cytb</i>	F: GCCTTCTCATCCGTAGTCCA R: TGCCACTTGTCCGATGATAA	60	Данная работа
<i>ND2/tRNA- Trp/tRNA-Ala</i>	F: ATCGCACATCTTGGCTGAAT R: AGCTTAATTAAGTATTTGTTTTGC	60	Данная работа
<i>PanI</i>	F: ACGTGCAATGCAAAGGAAGCGT R: GGCCAGGGCTGCAGTCACAA	60	Данная работа
<i>PACSIN3</i>	F: AATACAAAGTGGAGTTAGCCCG R: СТААТGCTGTCCTGTTAGAAGCA	60	Данная работа
<i>AQP11</i>	F: GCGATTCTACACTGCCCATTT R: ATATAACGGAGGGACTGGGATG	60	Данная работа

#### 2.2.4. Полногеномное секвенирование кильдинской трески

Концентрацию тотальной ДНК для каждого образца измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Life Technologies). Для полногеномного секвенирования была подготовлен пул геномной ДНК из 33 особей кильдинской трески, смешанной в равных пропорциях (MOG). Суммарное количество ДНК составило 2.5 нг. Для последующей транспортировки ДНК было высушено на вакуумном концентраторе Savant SpeedVac. Контроль качества, подготовка библиотеки и

секвенирование (парные чтения, 100+100 нуклеотидов) на платформе Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США) проведено в КНР в Пекинском институте геномики (Beijing Genomics Institute, <http://www.genomics.cn/en/>).

## **2.3. Статистические методы анализа**

### **2.3.1. Проверка селективной нейтральности маркеров**

Для проверки нейтральности микросателлитных и ядерных маркеров проводилась оценка отклонения от равновесия Харди-Вайнберга в программе GDA (Lewis, Zaykin 2001) с помощью точного теста Фишера. Также проверка нейтральности микросателлитных локусов осуществлялась с помощью теста Бомонта и Николса (Beaumont, Nichols 1996), основанного на соотношения  $F_{ST}$  и гетерозиготности, в программе LOSITAN (Antao *et al.*, 2008), и с помощью теста Фолла и Гагготти (Foll, Gaggiotti, 2008), основанного на байесовском подходе, в программе BayeScan (version 2.1 at <http://cmpg.unibe.ch/software/BayeScan/versions.html>) с дефолтными параметрами.

Для определения положения микросателлитных локусов в геноме, их последовательности и фланкирующие регионы, полученные из базы данных NCBI Nucleotide, были картированы на геном *Gadus morhua* (*gadMor1*, Star *et al.*, 2011) с помощью алгоритма BLAT в сервисе Ensembl Blast/BLAT (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>). Функциональная аннотация ближайших к микросателлитным маркерам генов по базе Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) была получена из Ensembl BioMart service (<http://www.ensembl.org/biomart/>).

### **2.3.2. Анализ демографической истории и численности популяции**

Количество взрослых особей в озерной популяции оценивалось с помощью метода «поймка-метка-повторная поимка» («capture-mark-recapture»; Krebs, 1999). При сборе биологического материала в 2011 году у рыб отрезали небольшой

фрагмент спинного плавника, после чего отпускали их обратно в озеро. В повторной экспедиции 2012 года при поимке рыб проводился осмотр, и отмечалось, какие особи пойманы повторно. Далее по мультилокусным генотипам оценивалась вероятность того, что они соответствуют пойманым ранее особям.

Определение эффективной численности проводилось в программе NeEstimator.v.2 (Do *et al.*, 2014) методом неравновесия по сцеплению (linkage disequilibrium) (Waples, Do, 2010). Другие два метода, реализованные в данной программе, не использовались, поскольку метод молекулярного сходства (molecular coancestry) применим только к отдельным возрастным группам (Nomura, 2008), а метод избытка гетерозигот (heterozygote excess) подходит для небольшого числа размножающихся особей, оцененного по большому количеству локусов и большой выборке (Luikart, Cornuet, 1999; Balloux, 2004).

Оценки недавней демографической истории, а именно сокращения численности популяций в недавнем прошлом, проводились в программе Bottleneck 1.2.02 (Luikart, Cornuet, 1998). Для этого тестировалось отклонение от мутационно-дрейфового равновесия за счет увеличения наблюдаемой доли гетерозигот и утраты редких аллелей с помощью теста знаков, теста знаков Уилкоксона (W-test) и теста сдвига моды (Mode-shift test). Параметры запуска программы: для микросателлитных локусов была использована двухфазная модель мутаций (two-phase model, TPM), с дисперсией 12 (Piry *et al.*, 1999), долей множественных мутаций 5% и 1000 итераций.

Дополнительно для выявления исторического сокращения численности популяций рассчитывался индекс неустойчивости (imbalance index; Kimmel *et al.*, 1998) и индекс экспансии (Zhivotovsky *et al.*, 2000), доверительные интервалы рассчитывались с помощью медианных статистик (Sachs *et al.*, 1982). Положительные (отрицательные) значения этих индексов указывают на долговременный рост (сокращение) эффективной численности популяции.

### 2.3.3. Дополнительные полногеномные данные

В данной работе дополнительно были использованы полногеномные последовательности из работы Карлсена и др., (Karlsen *et al.*, 2013) выборка из группировки севоро-восточной арктической трески (NEAC, доступна из базы SRA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) по номеру SRX110586) и выборка из прибрежной норвежской трески (NCC, SRA: SRX110509). Каждая из этих выборок получена при секвенировании смеси ДНК из 44 особей трески, секвенирование было проведено на платформе SOLID (Pandey *et al.*, 2008). Также в работе были использованы полногеномные последовательности из работы Кирубакарана и др., (Kirubakaran *et al.*, 2016), полученные при секвенировании (платформа Illumina) 104 особей трески мигрирующего и стационарного экотипов, а также их гибридов (доступны из базы ENA (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) по номеру PRJEB12803).

### 2.3.4. Анализ генетической дифференциации популяций

Оценка несмещенных значений  $F_{ST}$  (Weir and Cockerham 1984) проводилась в программе GDA (Lewis, Zaykin 2001), для расчета достоверностей при множественных сравнениях применялась поправка Бонферрони. Поправка на долю ложных предсказаний статистической значимости (q-value) рассчитывались в R пакете QVALUE (Storey *et al.*, 2015). Гомогенность образцов оценивалась через доверительные интервалы статистики  $F_{ST}$ , полученной с помощью 10000 бутстреп репликаций в программе GDA.

Анализ главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) по мультилокусным генотипам особей (микросателлитные данные) проводился в программе Genetix v.4.0 (Belkhir *et al.*, 1996-2004). Анализ главных координат (Principal Coordinate Analysis, PCoA) по выборкам трески с использованием расстояния Нея (Nei, 1972) и анализ молекулярной изменчивости (AMOVA; статистика  $\Phi_{PT}$ , 9999 пермутаций) проводились в программе GenAlEx4.5 (Peakall, Smouse, 2006). Для сравнения выборок с помощью PCoA по локусам

*PanI*, *PACSN3* и *AQP11* в качестве генетических расстояний между образцами использовался модуль средней по локусам разности частот стационарного варианта. Все три данных метода (AMOVA, PCA, PCoA) наглядно демонстрируют группировку особей и степень подразделенности популяций. Анализ главных компонент (PCA) и анализ главных координат (PCoA) достаточно схожи по своим принципам, однако в случае пропущенных данных и групповых сравнений эффективней использовать PCoA (Rohlf, 1972), также их отличают используемые метрики, соответственно, евклидово расстояние и расстояние Нея (либо любое другое расстояние). Анализ молекулярной изменчивости позволяет определить достоверности различий между разными иерархическими структурами и определить вклад молекулярной изменчивости на разных уровнях групповой (долю внутригрупповых и межгрупповых вариабельности) (Meirmans, 2012).

Анализ структуры популяций трески путём сравнения индивидуальных мультилокусных генотипов проводился с помощью байесовской кластеризации в программе Structure v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). В данном анализе были использованы только микросателлитные маркеры, нейтральные во всех популяциях (исключены локусы, отклоняющиеся от равновесия Харди-Вайнберга и не прошедшие проверки нейтральности другими тестами). Параметры анализа были следующими: количество тестируемых кластеров ( $K$ ) от 1 до 10, каждый с 10 повторностями, смешанная модель популяции (admixture), с независимыми частотами аллелей локусов (independent allele frequencies), отжиг (burn-in) 300000 шагов, суммарное количество шагов марковских цепей методом Монте-Карло (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) 1000000. Последующий выбор оптимального количества кластеров осуществлялся с помощью сервиса Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) методами максимального правдоподобия и  $\Delta K$ , который оценивает степень разброса значений логарифма вероятности разбиения для каждого  $K$  (Earl, 2012). Визуализация

полученных разбиений по кластерам проводилась на сервисе CLUMPAK (<http://clumpak.tau.ac.il/>).

Оценка долговременной эффективной численности, т.е. эффективной численности, учитывающей прошедшие демографические события в популяции, а также моделирование и оценка времени дивергенции озерной популяции от предковой морской популяции проводились в программе DIYABC.v.1.0 (Cornuet *et al.*, 2010) с помощью метода приближенных байесовских вычислений (ABC, Approximate Bayesian Computation) по микросателлитным данным. Используемые параметры: 10 млн. симуляций, исходная эффективная численность кильдинской трески от 10 до 1000 особей, исходная численность морской популяции от 100 до 10000 особей, исходное время дивергенции от 10 до 1000 поколений.

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.*, 2011b) с размером окна 1000 нуклеотидов и шагом в 1000 нуклеотидов. Визуализация и последующий анализ результатов проводился в статистической среде R (R Development Core Team, 2008).

### **2.3.5. Анализ внутрипопуляционной изменчивости**

Основные статистики аллельного разнообразия (ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность, несмещенная оценка гетерозиготности, количество аллелей в выборке, эффективное количество аллелей, индекс Шеннона и коэффициент инбридинга) оценивались по микросателлитным данным в программе GenAlEx4.5.

Оценка гаплотипического и нуклеотидного разнообразия митохондриальной ДНК и их стандартных ошибок проводилась в программе *DNASP 5.10.1* (Rozas *et al.*, 2003). Филогенетические деревья по митохондриальным маркерам строились методом ближайшего соседа (*Neighbor*

*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 ( $\text{Phred} < 20$ ) и фильтрация чтений по длине (менее 36 нуклеотидов) проводилось с программой *fastq-mcf* (Aronesty, 2011). Картирование последовательностей на геном выполнялось с помощью программы *bowtie2* (Langmead, Salzberg, 2012). Сортировка и фильтрация по качеству ( $\text{MQ} < 30$ ) 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 (инделов) выполнялось в программе *FreeBayes* (Garrison, Marth, 2012) с параметрами *-F 0.01* и *--pooled-continuous*, подходящими для анализа смешанных образцов. Фильтрация файлов с вариантами проводилась в *vcftools* (Danecek et al., 2011). Аннотация и предсказание возможных эффектов от вариантов была проведена в программе *SnPEff* (Cingolani et al., 2012) по базе *gadmor1.81* с дополнительным параметром *-lof* для предсказания мутаций, вызывающих потерю функции гена (*loss-of-function*). К этому типу относятся мутации потери/возникновения стоп-кодона, потери старт-кодона или сайта сплайсинга, сдвига рамки считывания (MacArthur et al., 2012), эта группа мутаций использовалась для оценки генетического груза в популяциях.

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 статистики  $\pi$  и  $D$  (Tajima 1989) в программе *Popoolation.v.1* (Kofler et al., 2011a), используя окна размером 1000 нуклеотидов и размер шага

1000 нуклеотидов. В последующем анализе были использованы только регионы (окна) с покрытием не менее 10 и не более 40. Последующий анализ и визуализация проводились в статистической среде R. Для определения принадлежности геномных регионов к определенной группе сцепления маркеры, использованные в работе Берга (Berg *et al.*, 2015) и для которых уже определены группы сцепления, картировались на референсный геном с помощью программы blast++ (Wang *et al.*, 2003).

Дополнительно поиск геномных регионов, которые потенциально могут находиться под отбором в настоящее время, осуществлялся с помощью алгоритма pool-HMM (Boitard *et al.*, 2013). Анализ проводился так, как описано в работе (Asgharian *et al.*, 2015): спектры аллельных частот оценивались по кодирующим регионам (CDS), предсказания проводились с помощью скрытых марковских моделей (Hidden Markov model, HMM) с параметрами  $\theta$  0.005 и 0.001,  $k$   $10^{-3}$  и  $10^{-6}$ .

### **2.3.6. 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). Порядок расположения маркеров по группам сцепления также был получен из данной работы Берга и др. Соответствие аллельных вариантов маркеров типам геномных регионов (мигрирующему либо стационарному) определялось по данным Берга (Paul Ragner Berg, личное сообщение). Последовательности, полученные при полногеномном секвенировании 33 особей кильдинской трески, были картированы с помощью программы bowtie2 в режиме локального выравнивания (*-local*) на последовательности маркеров, использованных в работе Берга и др. (Berg *et al.*, 2015), полученные из базы dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Поиск нуклеотидных вариантов по данным локусам проводился в программе

FreeBayes с параметрами *-F 0.01, --pooled-continuous, --report-monomorphic*. Только позиции с покрытием более 20, но менее 40, были использованы в последующем анализе. Соответствие аллелей маркеров определенному экотипу осуществлялось с помощью программы на языке perl (<https://www.perl.org/>), 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.

Ген *PanI* (pantophysin) находится на краю инверсии в LG1 (Kirubakaran *et al.*, 2016), аллель *PanI<sup>A</sup>* соответствует стационарному варианту, аллель *PanI<sup>B</sup>* – мигрирующему (Pogson, 2001). В данной работе были подобраны праймеры, которые могут амплифицировать оба аллеля (таблица 2.2). При секвенировании по Сэнгеру был использован прямой праймер. Генотипирование проводилось с помощью выравнивания полученных последовательностей на референс в программе Geneious4.5 (Kearse *et al.*, 2012). В качестве референса были использованы последовательности аллелей *PanI<sup>A</sup>* и *PanI<sup>B</sup>* из работы Погсона (NCBI PopSet:13123517, Pogson, 2001). Таким образом, с помощью данного метода для каждой особи сразу определялись оба аллеля данного гена.

В предыдущих работах, определивших генетические различия между экотипами трески, были использованы SNP-чипы (Bradbury *et al.*, 2010, Berg *et al.*, 2015) включающие в себя тысячи SNP маркеров, на основании которых в данной работе были подобраны маркеры для SNP-тестов. Для регионов LG2 и LG7 для выбора маркеров были использованы следующие критерии: (1) маркер находится внутри инверсии и внутри белок-кодирующего гена (Sodeland *et al.*, 2016, Berg *et al.*, 2015), (2) маркер «фиксирован», т.е. его аллельный вариант строго соответствует мигрирующему/стационарному типу региона (Sodeland *et al.*, 2016). В качестве такого маркера для региона LG2 был выбран *ss1712298457* («стационарный» аллель С, «мигрирующий» – Т), а для региона LG7 – маркер

*ss1712304271* («стационарный» аллель А, «мигрирующий» – С). Последовательности маркеров находятся в базе dbSNP. Данные маркеры были картированы на геном трески *gadMor1* с помощью программы blast++, для них на основании геномной последовательности были подобраны праймеры (таблица 2.2): пара праймеров для LG2 обозначена как PACSIN3, так как *ss1712298457* расположен в гене гомологичном PACSIN3; пара праймеров для региона LG7 обозначена AQP11, т.к. *ss1712304271* находится внутри гена AQP11. При выборе места посадки праймеров учитывался полиморфизм по геному (образец MOG, NEAC, NCC и смешанный образец), также принималось во внимание отсутствие инделов в амплифицируемых фрагментах. После соответствующих проверок было установлено, что данные пары праймеров работают на обоих вариантах регионов, так что при секвенировании этих фрагментов сразу возможно определять генотип особи. Генотипирование проводилось с помощью множественного выравнивания хроматограмм по данным фрагментам на соответствующие им референсные последовательности в программе Geneious 4.5.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. 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. После фильтрации по качеству и длине эти последовательности были картированы на референсный геном атлантической трески *gadMor1*. Средняя глубина покрытия референса составила 18.8 раз. После анализа нуклеотидной изменчивости было получено 711652 однонуклеотидных полиморфных позиций (single nucleotide polymorphism, SNP) по сравнению с референсной геномной последовательностью, из них 333891 сайта (47%) представлены двумя аллелями. Для сравнения, у NEAC-выборки было обнаружено 581692 однонуклеотидных замен, а в NCC-выборке 700999 однонуклеотидных замен (Karlsen *et al.*, 2013).

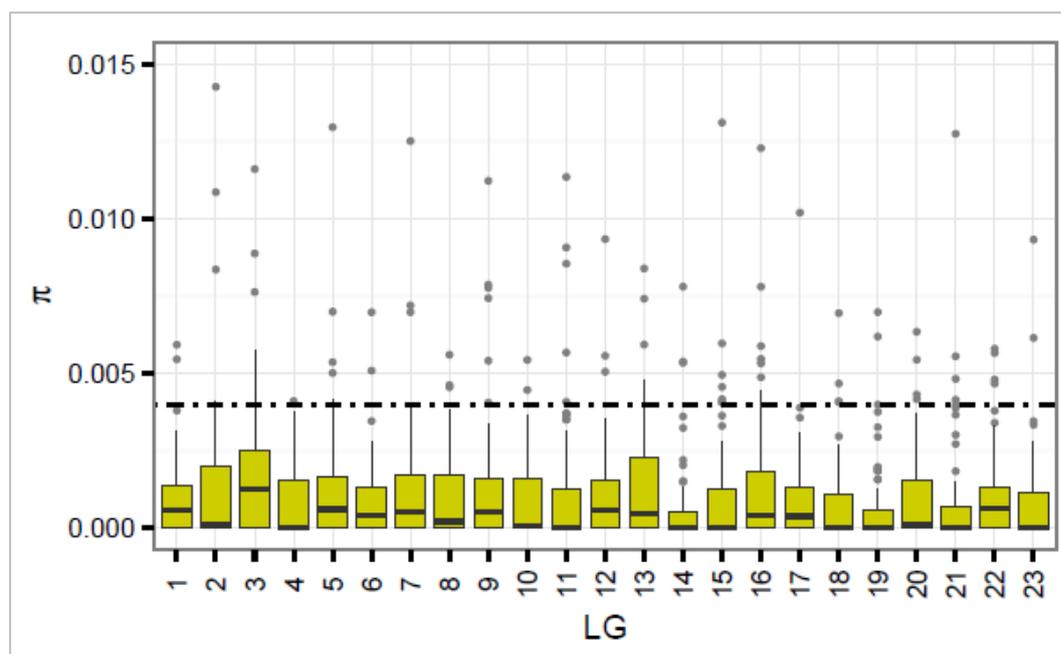


Рисунок 3.1 – Распределение  $\pi$  (Тажима, 1989) по 23 группам сцепления у кильдинской трески. Пунктирной горизонтальной линией отмечен верхний 95-перцентиль (0.0041).

Для изучения внутривидового разнообразия кильдинской трески было проанализировано 489458 участков генома, с кратностью покрытия более 15, но менее 40, что составило приблизительно 60% генома, среднее внутривидовое разнообразие  $\pi$  равнялось  $0.0012 \pm 0.0025$ , что приблизительно в четыре раза меньше, чем у морских выборок из работы Карлсена (Karlsen *et al.*, 2013): среднее  $\pi$  в NEAC равнялось  $0.0051 \pm 0.0029$ , а в NCC  $0.0054 \pm 0.0030$ . Внутривидовое разнообразие кильдинской трески низкое по всему геному, на рисунке 3.1 показано разнообразие по 23 группам сцепления (соответствующим 23 парам хромосом). Для регионов, сохранивших наибольшую изменчивость, а именно – для выходящих за пределы верхней 95%-й границы распределения статистики  $\pi$  (далее, для краткости, обозначаемой как 95-перцентиль), который равнялся 0.0041 (рисунок 3.1), был проведен функциональный анализ генов. Однако у кильдинской трески не было обнаружено никаких значимо преобладающих функциональных классов генов.

### 3.2. Поиск геномных регионов под отбором

У кильдинской трески среднее значение  $D$  равнялось  $0.0207 \pm 0.5552$ , что интерпретируется как то, что подавляющая часть популяционно-генетических процессов носит нейтральный характер. На рисунке 3.2 показана статистика по  $D$  для 23 групп сцепления. Высокое значение стандартного отклонения, вероятно, связано с тем, что данная статистика чувствительна к некоторым событиям в демографической истории популяций, таким как бутылочное горлышко и эффект основателя (Schmidt, Pool, 2002) и, вероятно, высокому уровню дрейфа.

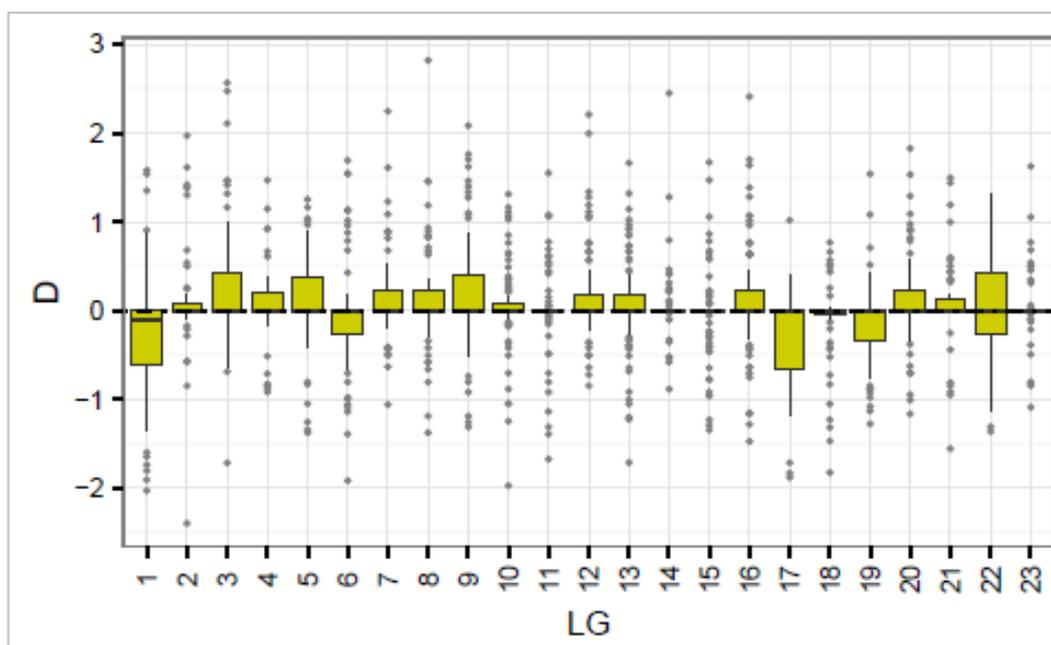


Рисунок 3.2 – Распределение D (Тажима, 1989) по 23 группам сцепления у кильдинской трески.

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. В целом, результаты показывают наличие следов генетического дрейфа и инбредной депрессии у кильдинской трески – характерных процессов для малых изолированных популяций.

### 3.3. Сравнение кильдинской трески с прибрежной и глубоководной треской

Среднее значение  $F_{ST}$  между популяцией трески озера Могильное и фьордовой выборкой (NCC), популяцией трески озера Могильное и баренцевоморской выборкой (NEAC) и между данной парой морских выборок составило соответственно  $0.183 \pm 0.177$ ,  $0.189 \pm 0.178$  и  $0.030 \pm 0.028$  (рисунок 3.3, А).  $F_{ST}$ -значения между озерной треской и обеими морскими выборками значительно скоррелированы ( $Z = 49.9921$ ,  $p$ -значение  $< 2.2e-16$ ,  $R^2 = 1$ ).

Суммарно было обнаружено 18697 регионов, для которых р-значения с поправкой на множественные сравнения меньше 0.005, и соответствуют 3012 геномным скаффолдам (рис 3.3, Б). В данных регионах не было обнаружено достоверно преобладающих функциональных групп генов по классификации базы Gene Ontology.

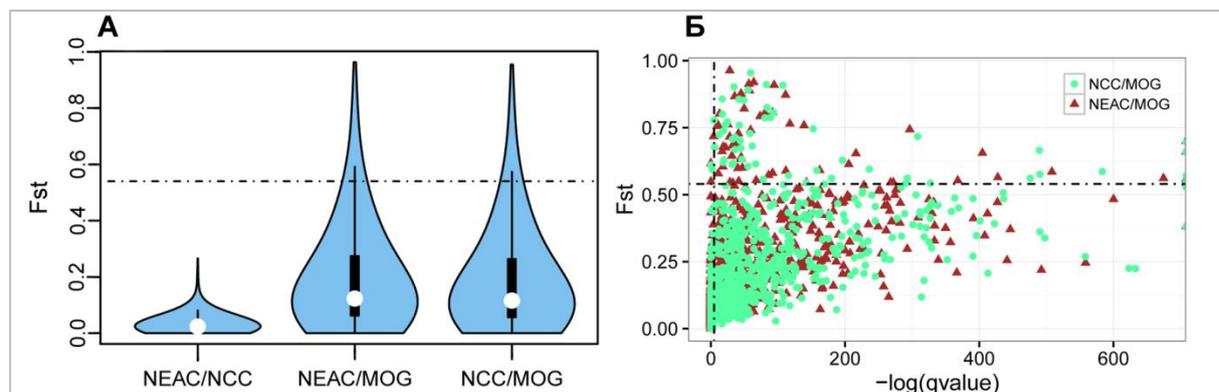


Рисунок 3.3 – Дифференциация кильдинской трески и морских выборок. **А** – скрипичная диаграмма для значений  $F_{ST}$  между кильдинской треской (MOG) и NEAC- и NCC-выборками. Пунктирной линией обозначен 95-перцентиль  $F_{ST}$  между озерной и морской выборками. Белая точка показывает среднее значение, черная вертикальная черта отражает квантили, синим цветом показана вероятностная плотность. **Б** – Распределение значений  $F_{ST}$  между озерной и морской выборками и логарифма q-value (статистической значимости различия с поправкой на долю ложных предсказаний). Обозначения как в А

### 3.4. Оценка генетического груза

Для анализа уровня генетического груза в озерной и морской популяциях была проведена оценка числа вредных мутаций, которые могут приводить к потере функции белка (loss-of-function, LOF). К данной группе мутаций относятся замены нуклеотидов и инделы, которые приводят к утрате старт-кодона, стоп-кодона, сайта сплайсинга, а также к сдвигу рамки считывания. В популяции кильдинской трески было обнаружено 1761 LOF мутаций при суммарном количестве вариантов 980402, а в смешанной морской выборке (MIX) – 1728 LOF, при общем количестве замен и инделов 1844829. Таким образом, процент предположительно вредных мутаций у кильдинской трески относительно всех

мутаций в кодирующих областях (0.18%) оказался в больше, чем у морской трески (0.093%). Для выборок NEAC и NCC доля LOF-замен также была меньше, чем в популяции кильдинской трески. Однако, учитывая небольшое покрытие и пуллированные данные, на основании данного результата нельзя сделать вывод об изменении доли вредных мутаций у кильдинской трески.

### **3.5. 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 (рисунок 3.4). 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. По данному локусу не было отклонения от равновесия Харди-Вайнберга. Что касается двух других геномных инверсий, то все генотипированные особи трески озера Могильное были гомозиготны по мигрирующему варианту в локусах *PACSIN3* (регион LG2) и *AQP11* (регион LG7), дополнительные статистики указаны в ПРИЛОЖЕНИИ (таблица 5).

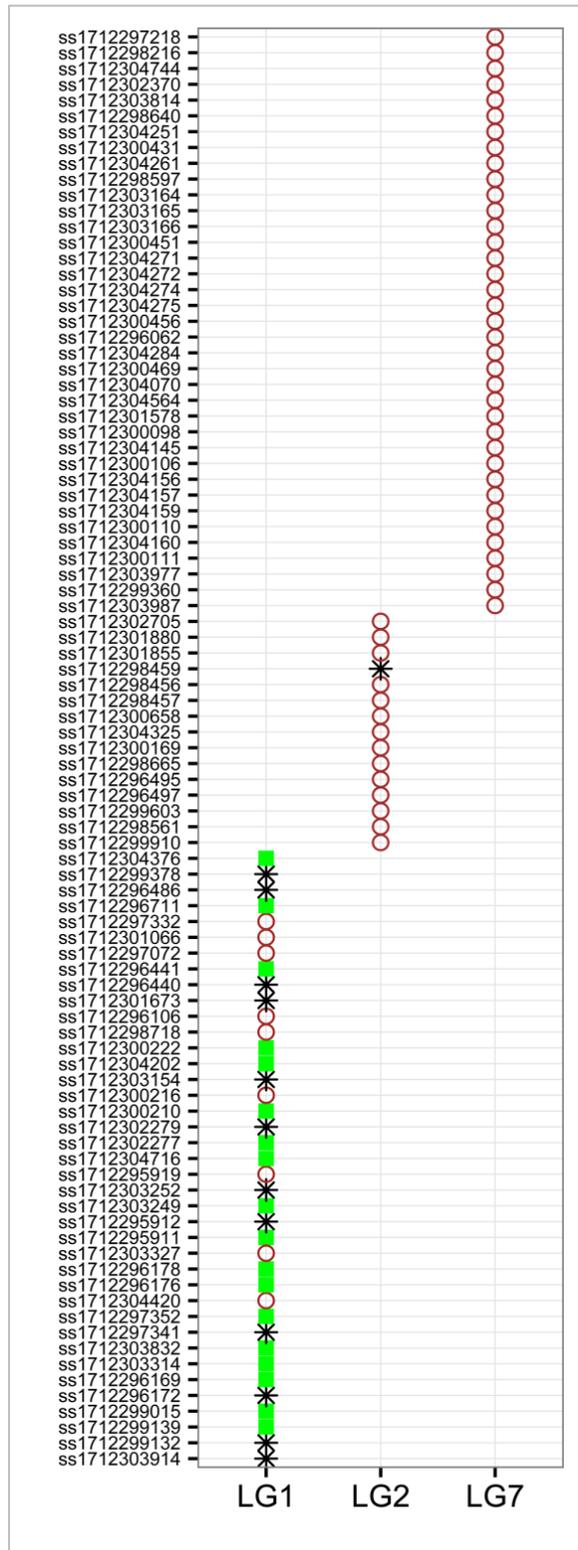


Рисунок 3.4 – Генотипирование регионов инверсий в LG1, LG2, LG7 кильдинской трески по полногеномным данным. Зеленый квадрат – стационарный вариант, коричневый круг – мигрирующий вариант, черная звезда – локус полиморфен по данному маркеру

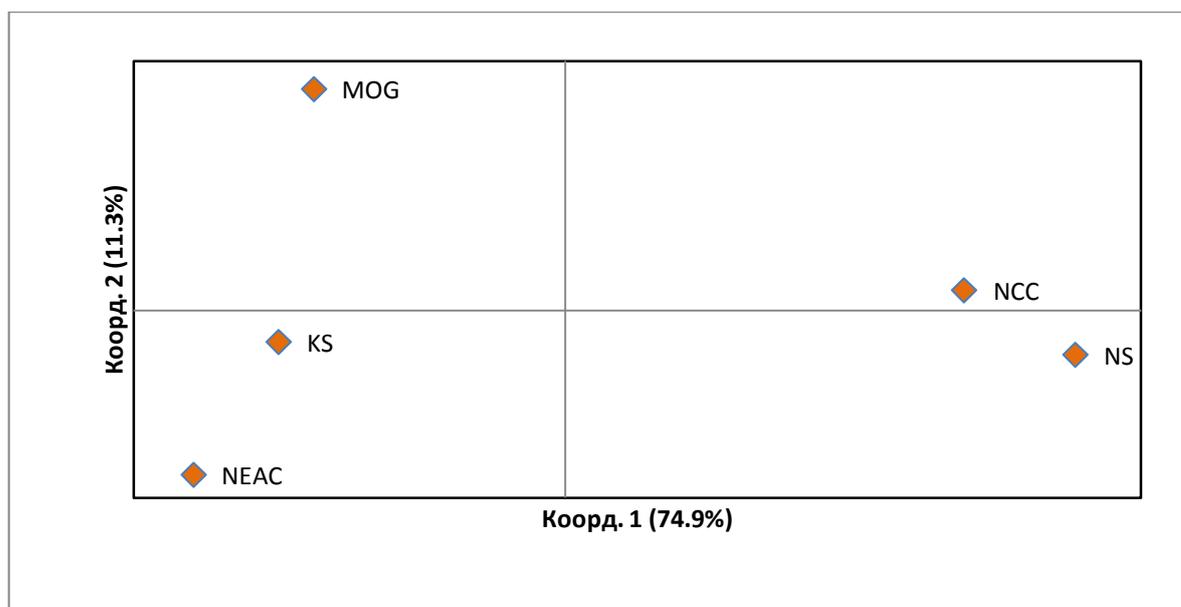


Рисунок 3.5 – Дифференциация выборок озерной и морской трески по локусам *PanI* (LG1), *PACSIN3* (LG2) и *AQP11* (LG7). Обозначения: MOG – треска озера Могильное, KS – треска Кильдинской салмы (KS12), NEAC – выборка трески Баренцева моря, NCC – выборка из фьордов Норвегии, NS – треска Северного моря. Частоты для трех последних выборок получены из работы Berg et al., 2016.

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. По *PanI* у данной морской выборки наблюдается значимое отклонение от равновесия Харди-Вайнберга в сторону преобладания гетерозигот, возможно, в результате действия стабилизирующего отбора.

Статистика по локусам *PanI*, *PACSIN3* и *AQP11* для озерной трески, выборки из Кильдинской салмы и трех популяций из работы Берга и др., (Berg et al., 2016) из Северного моря (NS), норвежских фьордов (NCC) и Баренцева моря (NEAC) представлены в ПРИЛОЖЕНИИ (таблица 5). Дифференциация этих выборок проиллюстрирована на рисунке 3.4.

### 3.6. 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). В популяции трески озера Могильное снижено число аллелей по всем исследованным локусам, из 15 локусов 10 были полиморфны, и только в одном локусе было представлено три аллеля (*GmoUCC-11*), причём один из них – крайне редкий; остальные полиморфные микросателлитные локусы имели лишь по два аллеля. В противоположность этому, в морских выборках все локусы полиморфны. Суммарно по всем исследованным локусам в озерной популяции выявлено 26 различных аллелей, а в морской – 176.

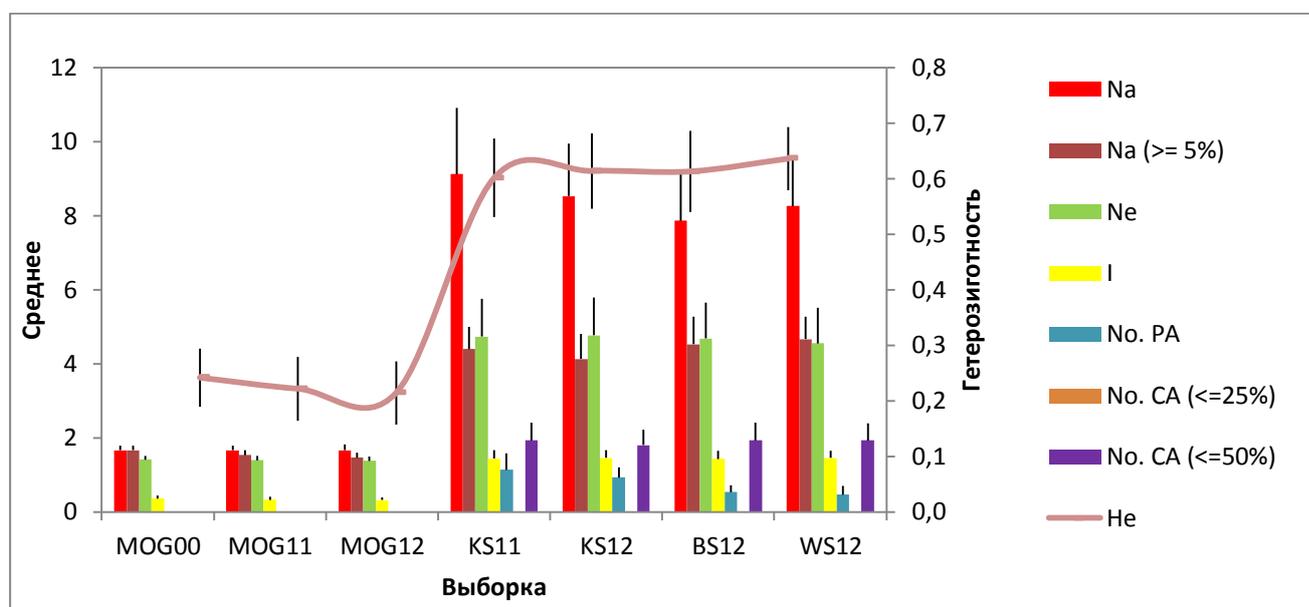


Рисунок 3.6 – Аллельные паттерны в выборках атлантической трески. Обозначения: Популяции обозначены в соответствии с таблицей 1.1. Na – среднее количество аллелей; Na (>= 5%) – среднее количество аллелей с частотой более 5%; Ne – среднее эффективное число аллелей, I – мера разнообразия (информационный индекс Шеннона), No. PA – количество аллелей уникальных для данной популяции; No. CA(<=25%) и No. CA(<=50%) – количество аллелей, распространенных не менее чем в 25% и, соответственно, в 50% исследованных популяций; He – ожидаемая гетерозиготность.

Все аллели, обнаруженные в популяции озерной трески, встречаются в морской популяции, т.е. не являются уникальными. Однако мильтилокусное

сочетание аллелей, вероятно, уникально для кильдинской трески, поскольку суммарная теоретическая частота подобных генотипов в морской популяции варьирует от  $4.4 \times 10^{-12}$  до  $1.9 \times 10^{-11}$ .

На рисунке 3.6 изображены статистики по микросателлитным локусам в исследуемых выборках, в таблице 3.1 представлены данные статистики, усредненные по географическим районам (озеро Могильное, Баренцево море, Белое море). Основные статистики (аллельное разнообразие, эффективное число аллелей, ожидаемая, наблюдаемая и несмещенная оценка гетерозиготности, индекса фиксации Райта и индекс Шеннона) по каждому из микросателлитных маркеров отдельно по выборкам приведены в ПРИЛОЖЕНИИ (таблица 1 и таблица 2, соответственно).

Таблица 3.1 – Оценка аллельного разнообразия в популяциях. Обозначения: с.о. – стандартное отклонение, N – количество исследованных особей по микросателлитным маркерам, Na – число различных аллелей, Ne – эффективное количество аллелей, I – индекс Шеннона, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, uHe – несмещенная оценка ожидаемой гетерозиготности, Fis – коэффициент инбридинга.

Район		N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	Fis
Озеро Могильное	Среднее	82,467	1,733	1,402	0,336	0,248	0,226	0,227	-0,081
	С.о.	0,689	0,153	0,109	0,079	0,063	0,057	0,057	0,024
Баренцево Море	Среднее	97,533	11,800	5,179	1,532	0,614	0,616	0,620	0,002
	С.о.	6,675	2,116	1,194	0,229	0,071	0,069	0,070	0,023
Белое Море	Среднее	40,733	8,267	4,555	1,452	0,608	0,637	0,645	0,044
	С.о.	2,008	1,343	0,957	0,192	0,062	0,057	0,058	0,039

В данной работе была повторно исследована выборка трески озера Могильное, собранная в 2000 году, проанализированная по некоторым маркерам в работе Строганова и др. (Строганов и др., 2011). В цитируемой работе было показано, что полиморфными являются локусы *Gmo8*, *Gmo\_G12*, *Gmo\_G18*, *Gmo19*, *Gmo35*. Однако при перепроверке биологических проб было установлено, что только три из этих пяти локусов (*Gmo8*, *Gmo19*, *Gmo35*) были вариабельны (статистика по локусам приведена в ПРИЛОЖЕНИЕ, таблица 1), а два других – мономорфны. Таким образом, между выборками трески из озера Могильное,

взятыми в 2000, 2011 и 2012 годах, нет изменений по разнообразию по исследованным микросателлитным маркерам.

Значения наблюдаемой гетерозиготности в морских выборках варьируют 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 (таблица 1.1). Данные результаты указывают на общее снижение разнообразия в популяции озерной трески по сравнению с морской треской.

Индекс фиксации Райта ( $F_{IS}$ ), отражает степень инбридинга особей относительно популяции (Wright, 1978). В других выборках не было суммарного увеличения либо уменьшения доли гетерозигот (см. таблицу 3 в ПРИЛОЖЕНИИ).

### **3.7. Расположение в геноме и проверка нейтральности микросателлитных маркеров**

При картировании используемых в данной работе микросателлитных локусов на референсный геном трески (*gadMor1*) было установлено, что тринадцать из пятнадцати локусов находятся недалеко либо внутри белок-кодирующих генов (см. таблицу 4 в ПРИЛОЖЕНИИ). Два локуса находятся в 5' нетранслируемом регионе (5'-UTR), три локуса в 3' нетранслируемых областях генов (3'-UTR), восемь локусов – в интронах генов и один близко к «constraint element» - геномному участку консервативному у 10 костистых рыб (Lee *et al.*, 2011). Только для одного маркера, *Gmo-C20*, было заранее (до нашего картирования) известно, что он ассоциирован с геном (Stenvik *et al.*, 2006). Расположение остальных микросателлитных локусов было определено впервые в данной работе; названия генов, их функциональная аннотация и геномные координаты находятся в ПРИЛОЖЕНИИ (таблица 4).

При проверке нейтральности микросателлитных локусов было показано, что в морских популяциях (Баренцево и Белое моря) есть несколько микросателлитных маркеров, которые, вероятно, находятся под отбором. Тест

Фолла и Гаггиотти, основанный на соотношении  $F_{ST}$  и апостериорной вероятности модели отбора по отношению к нейтральной модели (PO, posterior odds), выявил в морских популяциях один маркер, который, возможно, находится под отбором (*Gmo8*, вероятность 0.87), и три маркера (*Gmo19*, *PGmo95*, *Gmo-C20*), которые с большой вероятностью (0.98) ассоциированы с отбором (рисунок 3.7, А). Тест Бомонта и Николса, основанный на соотношения  $F_{ST}$  и гетерозиготности, показал, что, вероятно, локус *Gmo-G12* находится под направленным отбором, а локус *PGmo-95* – под балансирующим отбором (рисунок 3.8, А).

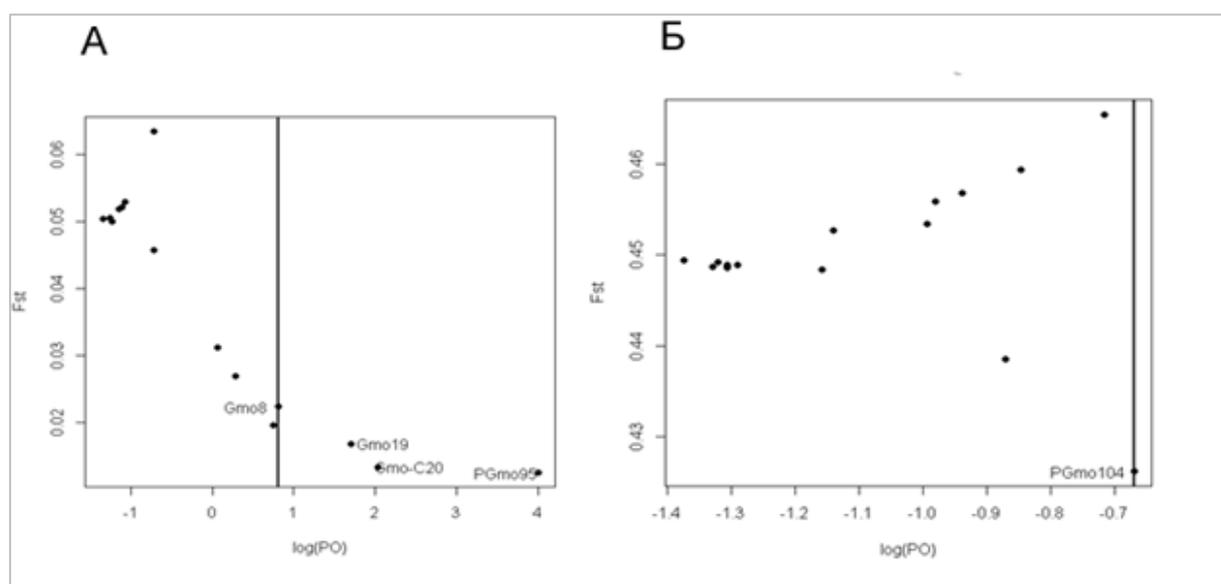


Рисунок 3.7 – Проверка селективной нейтральности микросателлитных маркеров методом Фолла и Гаггиотти. А – Результаты теста для выборок Баренцева и Белого морей., маркеры *Gmo8*, *Gmo19*, *Gmo-C20* и *PGmo95*, вероятно, находятся под отбором. Б – Результаты теста для трески Кильдинской салмы и озера Могильное, все маркеры нейтральные.

Однако, при оценке тестами нейтральности микросателлитных маркеров у образцов из Баренцева моря и озера Могильное не было обнаружено никаких отклонений от ожидаемого распределения и, следовательно, все маркеры вели себя как селективно нейтральные (рисунок 3.7, Б и 3.8, Б).

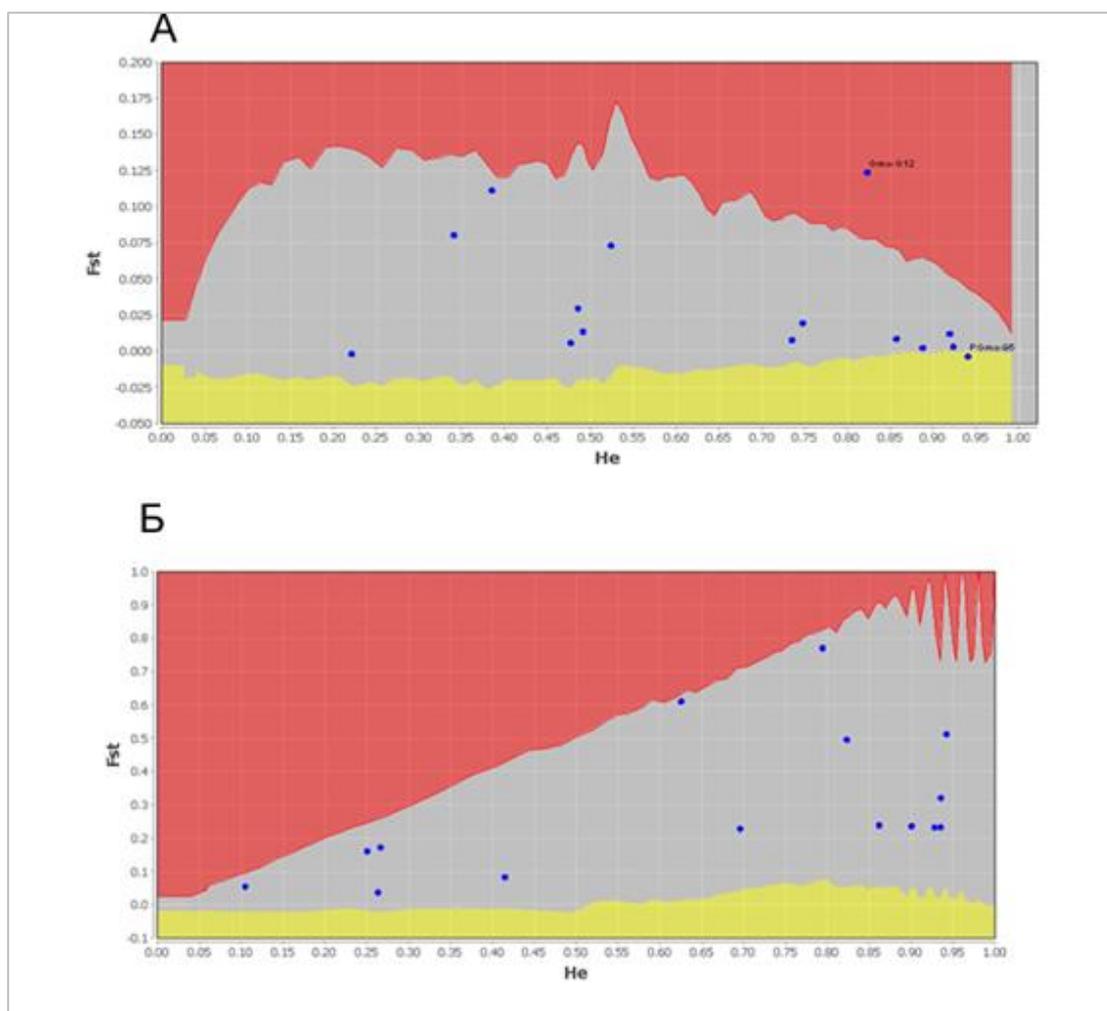


Рисунок 3.8 – Анализ нейтральности микросателлитных маркеров методом Бомона и Николса. **А** –Выборки Белого и Баренцева моря. Обозначения: синие точки – маркеры, серая область «нейтральная зона», желтая область – «балансирующий отбор», красная область – «направленный». **Б** – Выборки озерной и баренцевоморской трески. Обозначения как в А.

При оценке отклонения микросателлитных локусов от равновесия Харди-Вайнберга из 60-ти проведенных тестов только для 7 локусов значение р-статистики было менее 0.05. Однако после проведения коррекции на множественное сравнение только один локус показывал значимое отклонение: *GmoUCC-11* в беломорской популяции (ПРИЛОЖЕНИЕ, таблица 3). Все маркеры, которые не прошли проверку на нейтральность у беломорской популяции (*Gmo19*, *Gmo-C20*, *Gmo-G12*, *PGmo-95*, *GmoUCC-11*), были исключены из тех анализов, в которых использовались образцы трески из Белого моря.

### 3.8. 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 ( $F_{STt}$  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 3.2). Между всеми выборками морской трески была также показана достоверно значимая подразделенность, кроме пар KS11/KS12 и KS11/BS12.

Таблица 3.2 – Генетическая дифференциация между выборками трески. Над диагональю  $F_{ST}$  (WC84), под диагональю значения уровня значимости с поправкой Бонферрони. Обозначения: н/з – не значимо, достоверность различий ( $>0.1$ ); названия выборок соответствуют таблице 1.1.

	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	

Все морские выборки гетерогенны: между Кильдинской салмой и Баренцевым морем статистика  $F_{ST}$  равнялась 0.012, с 95% доверительным интервалом от 0.003 до 0.024; между Кильдинской салмой и Белым морем  $F_{ST}$  равна 0.027, 95 % доверительный интервал от 0.009 до 0.051; между выборкой из Баренцева моря и из Белого моря 0.045 с доверительным интервалом от 0.014 до 0.084.

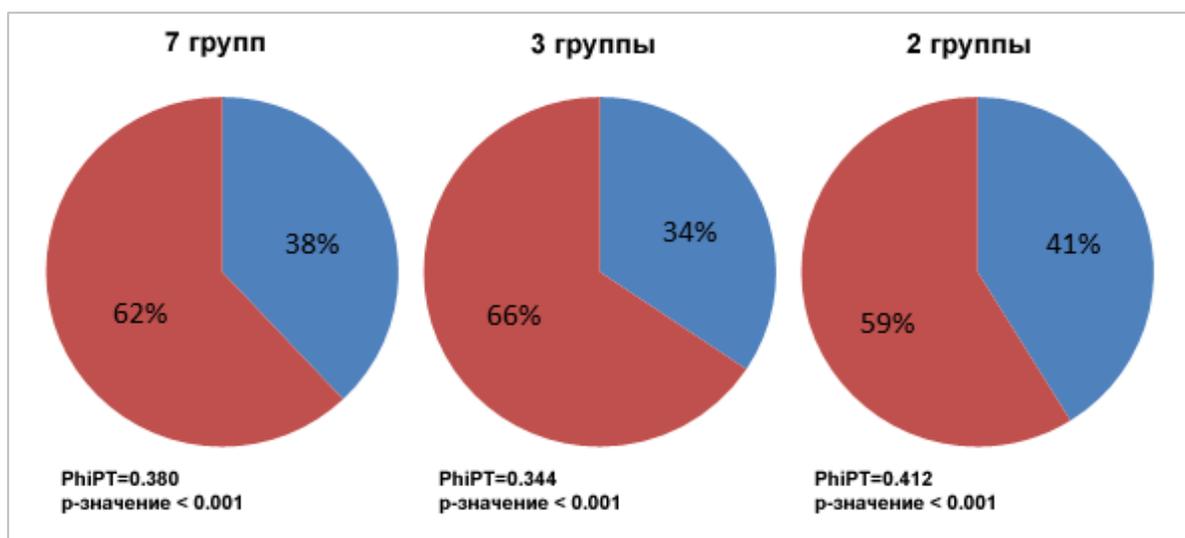


Рисунок 3.9 – Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA). Красным цветом показан процент внутригрупповая изменчивость, синим – межгрупповой. Разъяснения по составу исследуемых групп – в тексте.

Анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) отражает структуру изучаемых групп рыб через разложение представленной изменчивости по компонентам разных иерархических уровней. Было проанализировано три варианта группировок образцов: без группировки по географическим районам (7 групп соответствующих выборкам, рисунок 3.9); 3 группы – объединение образцов озера Могильное (MOG00, MOG11, MOG12), Баренцева моря (KS11, KS12, BS12) и Белое море (WS12); 2 группы – озерная треска (MOG00, MOG11, MOG12) и морская треска (KS11, KS12, BS12, WS12). Все три варианта разбиения дали значимые различия между группировками (p-значение < 0.001). Процент межгрупповой изменчивости варьировал от 34% до 41%. Наибольший процент межгрупповой изменчивости был при разбиении выборок на 2 группы, морскую и озерную (рисунок 3.9). Процент межгрупповых молекулярных различий между выборками Баренцева и Белого моря соответствовал 3%.

Для изучения подразделенности трески был использован анализ главных компонент по особям. На рисунке 3.10 можно заметить, что треска разделяется на 2 группы, в первую группу входят представители озерной популяции, во вторую – группы особи из морских выборок. Во второй группе нет видимого подразделения

особей по географическим районам, что, вероятно, связано с небольшой дифференциацией и высокой степенью индивидуальных отличий. На рисунке 3.11 показан анализ главных координат по выборкам, все морские выборки значительно отделяются от озерной, по осям указан процент молекулярных отличий.

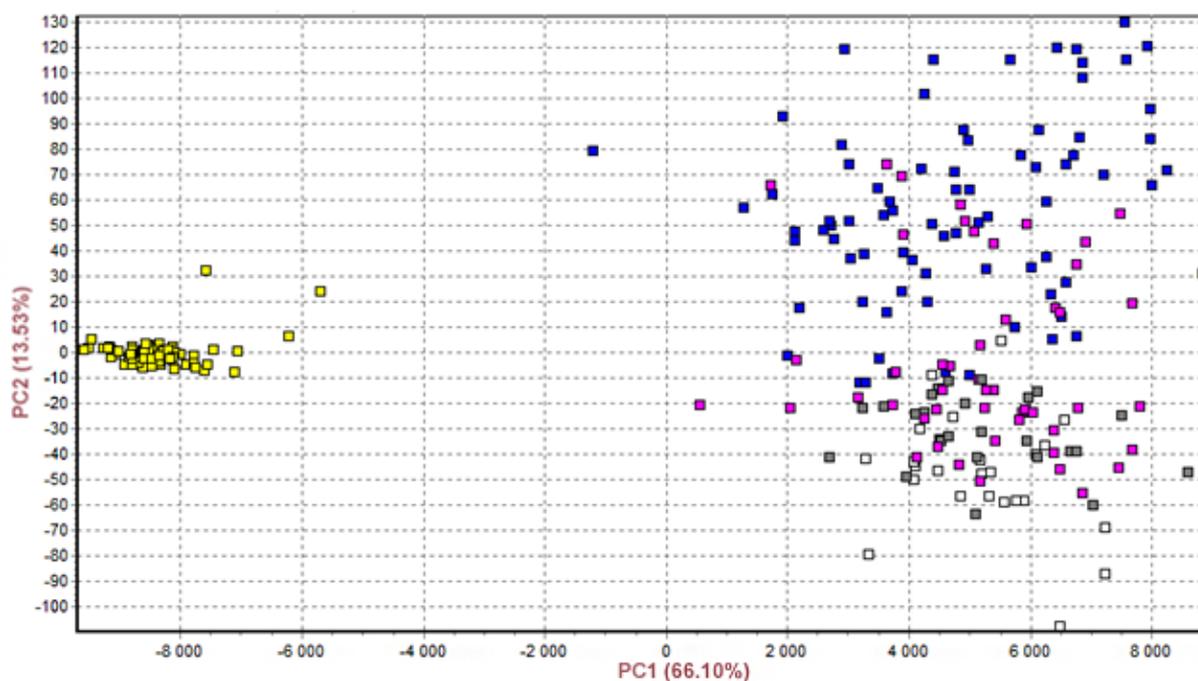


Рисунок 3.10 – Анализ главных компонент. Обозначения: желтым цветом показаны особи из озера Могильное (MOG00, MOG11, MOG12), белым – KS12, фиолетовым – WS12, серым – BS12, синим – KS11. Названия выборок соответствуют таблице 1.1.



Рисунок 3.11 – Анализ главных координат по исследуемым выборкам. Обозначения выборок как в таблице 1.1. При расчете использовано генетическое расстояние Нея (Nei, 1972).

Для определения того на сколько групп разделяются исследуемые образцы был использован байесовский кластерный анализ. В данном анализе были использованы только те микросателлитные локусы, которые были тестированы как селективно нейтральные для всех выборок. Оптимальное количество кластеров оценивалось с помощью методов *deltaK* (рис. 3.12, А) и максимального правдоподобия (рис 3.12, Б) – и в обоих случаях соответствовало двум кластерам ( $K=2$ ).

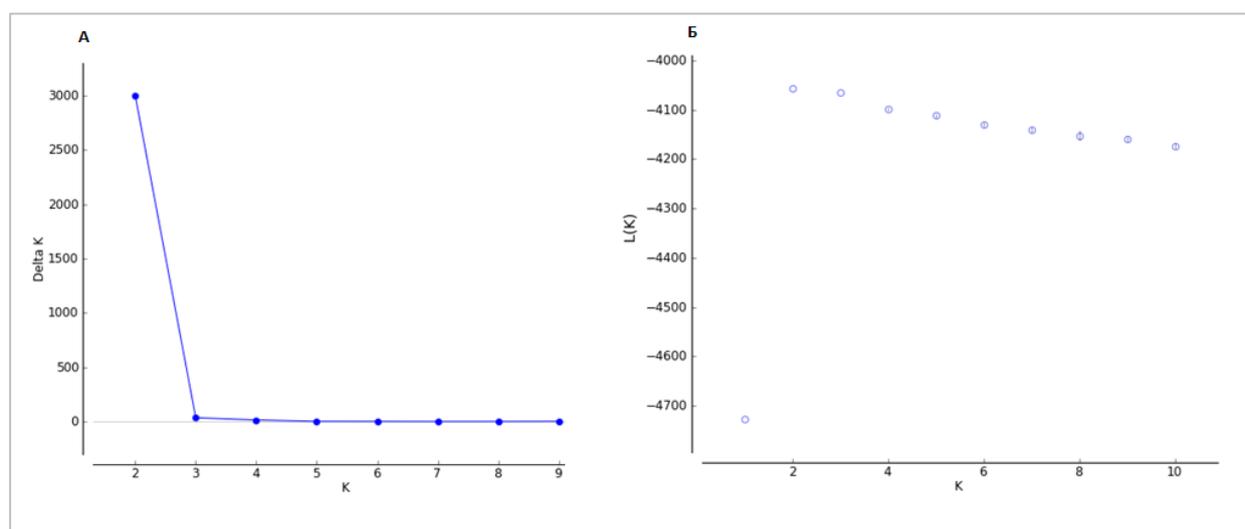


Рисунок 3.12 – Оценка оптимального количества кластеров. А – статистика *deltaK* учитывается разброс значений по репликациям; Б – среднее значение вероятности разбиения на К кластеров,  $L(K)$ , и его стандартное отклонение.

На рисунке 3.13 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.

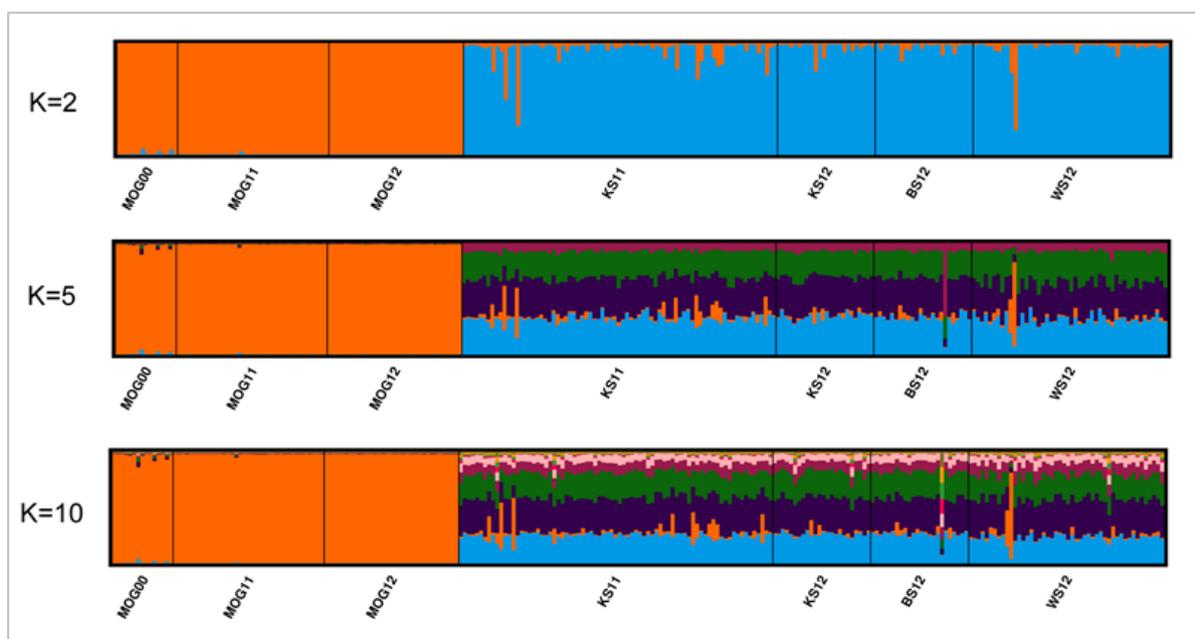


Рисунок 3.13 – Значения апостериорной вероятности принадлежности к кластерам для значений  $K=2$  (наилучшее разбиение),  $K=5$  и  $K=10$ . Оценка оптимального количества кластеров. Обозначения выборок соответствует таблице 1.1.

### 3.9. Оценка численности кильдинской трески

Оценка численности озерной популяции проводилась двумя способами: эхолотной съемкой и с помощью метода максимального правдоподобия по количеству повторно пойманных рыб. По данным эхолотной съемки в экспедиции 2012 года число взрослых особей было 250-300 шт. В экспедиции 2012 года было поймано 6 рыб с физическими метками, оставленных на рыбах, пойманных с последующим выпуском обратно в озеро в нашей экспедиции на о. Кильдин в 2011 году. Эти предположительно вторично пойманные особи были перепроверены генетически. И действительно, для всех этих особей были найдены идентичные образцы в выборке 2011 года по 15-ти микросателлитным маркерам ( $p$ -значение  $<0.001$ ). 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 («Реликтовое озеро...» 2002).

### 3.10. Оценка эффективной численности

Было показано, что долговременная эффективная численность кильдинской трески достаточно низкая, медианное значение – 107 особей с широким доверительным интервалом. Размер эффективной численности трески из Кильдинской салмы больше, чем у озерной трески, на два порядка (таблица 3.3). Эффективная численность Кильдинской трески в настоящее время, оцененное методом неравновесия по сцеплению (linkage disequilibrium), составило 183 особей с нижней оценкой 27 особей. Аналогичная средняя оценка для морской популяции (по объединенным выборкам из Кильдинской салмы) значительно больше, нижняя оценка составила 496 особей.

Оценка долговременной эффективной численности проводилась методом приближённых байесовских вычислений (ABC, Approximate Bayesian Computation.). Этот метод, в отличие от методов точечной оценки, позволяет оценить эффективную численность как малых, так и больших популяций. Эффективная численность кильдинской трески и морской популяции (Кильдинская салма) представлены в таблице 3.3 и рисунке 3.14. Значение медианы эффективной численности для озерной трески составило 107 особей с 95% доверительным интервалом от 26 до 392, для морской популяции медиана составила  $1.57 \times 10^4$  с 95% доверительным интервалом от  $0.32 \times 10^4$  до  $3.67 \times 10^4$ .

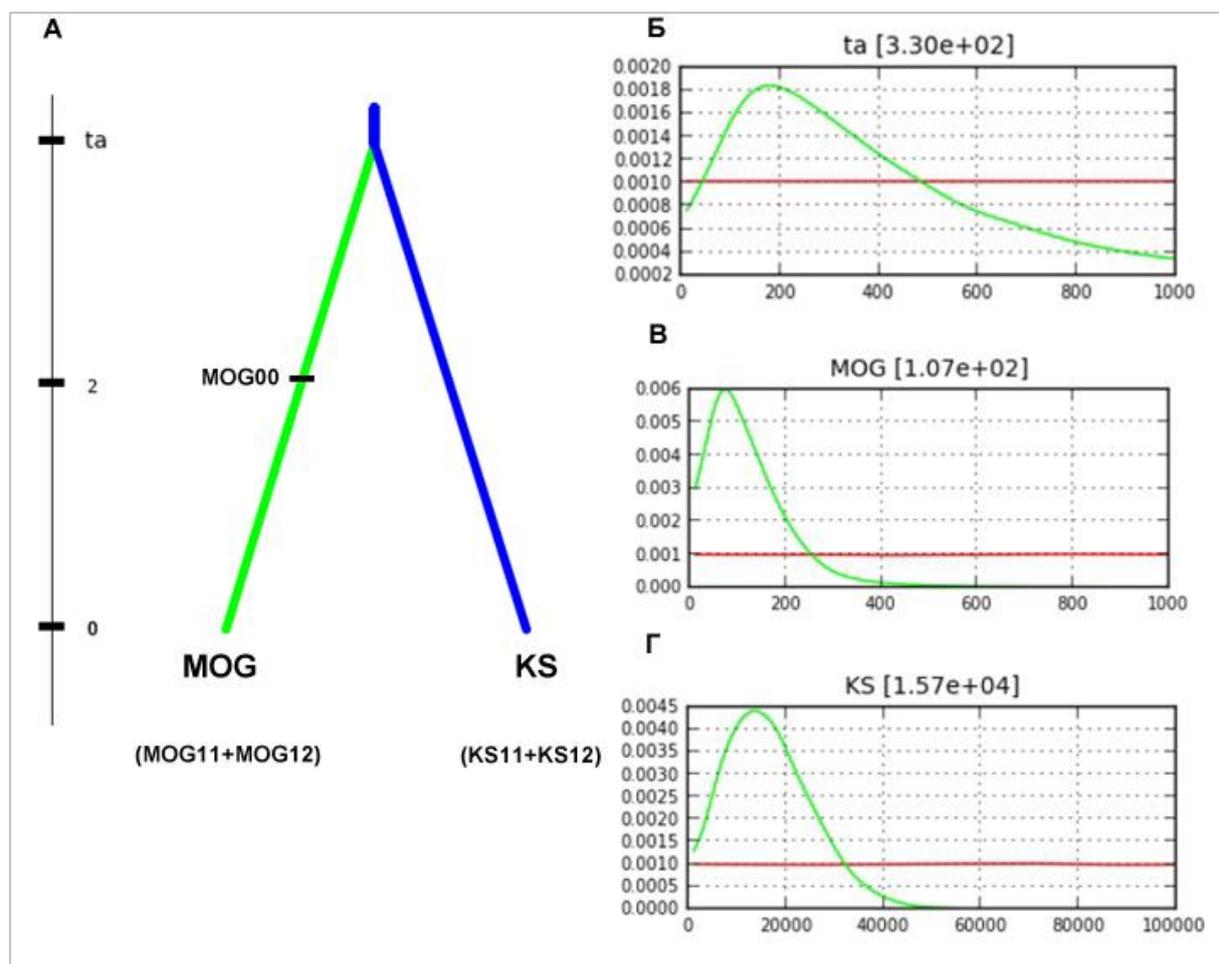


Рисунок 3.14 – Распределение априорных и апостериорных вероятностей значений параметров. Красным цветом показано распределение априорной вероятности, зеленым – апостериорной вероятности. **А** – в демографической модели были использованы объединенные выборки трески озера Могильное 2011 и 2012 гг., выборка 2000 года (~2 поколения назад), объединенные выборки 2011 и 2012 гг. из Кильдинской салмы. Слева указана ось времени. Обозначения выборок соответствуют таблице 1.1, **Б** – распределение времени дивергенции популяций  $t_a$  (в поколениях). **В** и **Г** – распределение долговременной эффективной численности (в штуках особей), соответственно, озерной кильдинской трески (MOG) и морской трески (KS, Кильдинская салма).

### 3.11. 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 (рисунок 3.14). По результатам анализа медианное время разделения популяций озерной и морской трески составило 330 поколений. Если считать, что поколение трески равняется 5-6

годам (Мухина и др., 2002), то кильдинская треска отделилась 1800 лет назад с 50% доверительным интервалом от 500 до 3000 лет. Такой результат хорошо согласуется с геологическими данными по последнему времени отделения озера Могильное от Кильдинской салмы (Гуревич, Лийва, 1975).

Таблица 3.3 – Оценки и доверительные интервалы долговременной эффективной численности и времени дивергенции озерной трески от морской (см. рисунок 3.14).

Статистика	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)	$1.68 \times 10^4$	$1.57 \times 10^4$	$1.23 \times 10^4$	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 (поколения)	384	330	114	95 % CI	[62, 929]
				90 % CI	[80, 868]
				50 % CI	[85, 545]

### 3.12. Демографическая история кильдинской трески

Методом Лукарта и Корнета (Luikart, Cornuet, 1998), примененного в программе Bottleneck, ни для одной из исследуемых популяций не было обнаружено недавнего резкого сокращения численности («бутылочного горлышка»), так как не было зафиксировано отклонения от мутационно-дрейфового равновесия и статистически значимого увеличения доли гетерозигот (таблица 3.4). Это указывает на то, что в исследуемых популяциях не происходило резкого сокращения численности в недавнем эволюционном прошлом кильдинской трески.

Таблица 3.4 – Результаты проверки отклонения от мутационно-дрейфового равновесия. Р-значения приведены без поправки на множественное сравнение. MOG – объединенная выборка рыб из озера Могильное, остальные соответствуют обозначениям в таблице 1.1.

Выборка	Тест знаков, р-значение	W-критерий знаков, р-значение	Сдвиг моды
MOG	0.106	0.097	Нет
KS11	0.047	0.985	Нет
KS12	0.013	0.987	Нет
BS12	0.120	0.979	Нет
WS12	0.012	0.972	Нет

На рисунке 3.15 показаны 95% доверительные интервалы индексов неустойчивости и экспансии, отрицательные (положительные) значения указывают на сокращение (увеличение) численности популяции в недавнем прошлом. Однако изменения считаются недостоверными, если в доверительный интервал входит ноль. Анализ значений индексов неустойчивости и экспансии не выявил значительного увеличения либо сокращения численности популяций в эволюционном прошлом кильдинской трески. Таким образом, данные результаты согласуются с результатами метода Лукарта и Корнета.

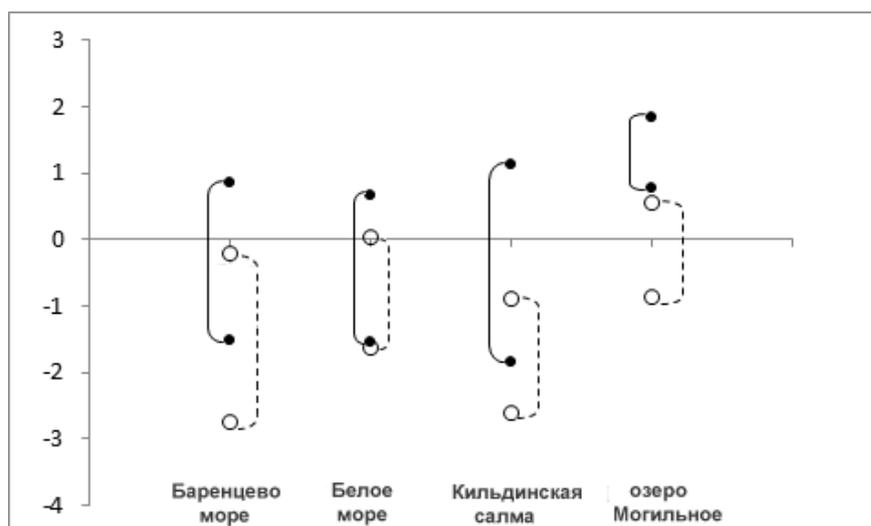


Рисунок 3.15 95% доверительный интервал индекса неустойчивости (белые круги) и экспансии (черные круги) в озерной и морских выборках трески. Разъяснения в тексте.

### 3.13. Анализ генетического разнообразия митохондриальной ДНК озерной и морской трески

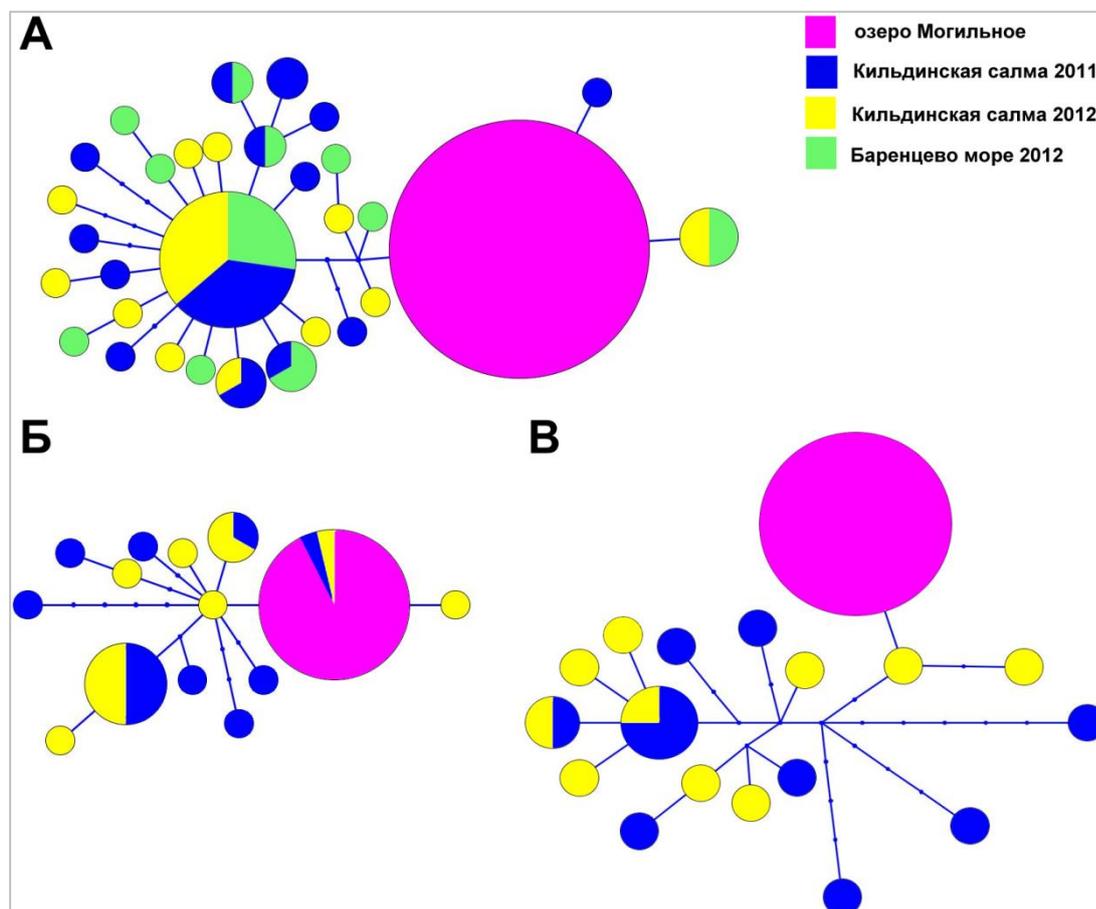


Рисунок 3.16 – Изменчивость митохондриальной ДНК. А – медианная гаплотипическая сеть, построенная по фрагменту *ND2/tRNA-Trp/tRNA-Ala*, Б – сеть по фрагменту *cytB*, В – сеть по объединённым гаплотипам

У популяции морской трески (выборки 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 – у всех исследованных особей присутствовал только один единственный гаплотип. На рисунке 3.16 показана медианная гаплотипическая сеть по фрагменту *ND2/tRNA-Trp/tRNA-Ala*, фрагменту *cytB* и по объединённому гаплотипу обоих фрагментов. Не исключено, что митохондриальный гаплотип озерной трески мог возникнуть не у кильдинской трески, а быть у морской

трески, поскольку его отличает от одного из гаплотипов баренцевоморской популяции одна нуклеотидная замена по изученным фрагментам мтДНК. Но не исключено также, что эта замена могла независимо возникнуть в озёрной популяции.

Таблица 3.5 – Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие фрагментов митохондриальной ДНК. Обозначения: N-количество образцов, Nh – количество гаплотипов, Ns- количество полиморфных сайтов, Hd – гаплотипическое разнообразие, pi – нуклеотидное разнообразие, SD – стандартное отклонение.

		Фрагмент									
		<i>ND2/tr3</i>					<i>cytb</i>				
		N	Nh	Ns	Hd (SD)	Pi (SD)	N	Nh	Ns	Hd (SD)	Pi (SD)
Выборка	MOG	79	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	25	1	0	0 (0)	0 (0)
	KS11	23	14	16	0,881 (0,062)	0,074 (0,012)	12	9	18	0,909 (0,079)	0,188 (0,031)
	KS12	20	12	12	0,847 (0,079)	0,066 (0,013)	12	8	8	0,894 (0,078)	0,116 (0,014)
	BS12	18	12	12	0,895 (0,065)	0,079 (0,013)	-	-	-	-	-

Значительная генетическая дивергенция озёрной популяции от морской и отсутствие у неё внутрипопуляционной генетической изменчивости, вероятно, связаны с длительной изоляцией при малой эффективной численности популяции (с генетическим дрейфом). Данные по гаплотипическому и нуклеотидному разнообразию представлены в таблице 3.5. Все полученные последовательности депонированы в GenBank под номерами KP293228–KP293417.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1. 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). Поскольку известно, что для атлантической трески характерно образование изолированных и полуизолированных группировок, часто обитающих на небольшой глубине (Hardie *et al.*, 2006) в данной работе была проведена проверка гипотезы о происхождении кильдинской трески от стационарной формы вида. В работе Берга и соавторов (Berg *et al.*, 2016) у атлантической трески были идентифицированы три полиморфных протяженных геномных региона (LG1, LG2 и LG7), по которым стационарный и мигрирующий экотипы трески отличаются друг от друга.

В хромосоме 1 (первая группа сцепления, содержит LG1) около 1.6 млн. лет назад в восточной части ареала у атлантической трески возникла протяженная двойная инверсия (Kirubakaran *et al.*, 2016), которую обозначают как «мигрирующий» вариант геномного региона LG1, т.к. в основном он преобладает в мигрирующем экотипе трески. Таким образом, предковой формой атлантической трески является стационарный экотип (прибрежная треска), а мигрирующий экотип (глубоководная треска) – это производная форма. Локус LG1 содержит 763 гена, из которых 321, вероятно, могут быть ассоциированы с дифференциацией стационарного и мигрирующего экотипа и их адаптацией к различному образу жизни и поведенческим паттернам. Некоторые из этих генов вовлечены в газовый обмен и регуляцию работы плавательного пузыря, другие гены – в процессы формирования мышц, энергетический обмен, синтез гемоглобина и, возможно, ориентацию в пространстве (Kirubakaran *et al.*, 2016). Показано, что LG1 достоверно коррелирует с глубиной обитания рыб (Макеенко и др., 2014; Berg *et al.*, 2016). Данный локус находится под сильным направленным отбором у глубоководной трески, однако он селективно нейтрален в прибрежном стаде трески, где в основном наблюдается

стационарный вариант локуса и нет отклонения от равновесия Харди-Вайнберга (Berg *et al.*, 2016). По полногеномным данным нами было определено, что данный геномный регион полиморфен у озерной трески (рисунок 3.4). А при индивидуальном генотипировании было установлено, что в популяции кильдинской трески преобладает стационарный аллель PanI<sup>A</sup> (частота 0.8) и нет отклонения от равновесия Харди-Вайнберга. Отсутствие отбора по LG1 у озерной трески может быть связано с небольшой глубиной ее обитания и со сниженной двигательной активностью (Строганов и др., 2015). 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). В выборках из Кильдинской салмы наблюдались различные частоты стационарного варианта, от 0.2 (без отклонения от равновесия Харди-Вайнберга; Макеенко и др., 2014), до 0.5 (с достоверным отклонением от равновесия Харди-Вайнберга; KS12, таблица 5 в ПРИЛОЖЕНИИ). Вероятно, такие различия могут быть связаны с отличающимися местами сбора материала (в частности, глубиной, на которой ловились рыбы).

По литературным данным известно, что регионы инверсий LG2 и LG7 ассоциированы с уровнем солености и содержанием кислорода (Berg *et al.*, 2016). Кильдинская треска живет в достаточно резком градиенте солености, от 8 до 28 ‰, и даже способна кратковременно заплывать в пресный слой озера (Цееб, 1975в; наши наблюдения). По результатам полногеномного анализа и последующей индивидуальной проверки было показано, что все особи озерной трески соответствуют мигрирующему варианту инверсий в LG2 и LG7. Частоты вариантов по двум данным геномным регионам очень сильно различаются между экотипами, (Bradbury *et al.*, 2010, 2014; Berg *et al.*, 2015, 2016). Нами было показано, что у кильдинской трески представлен мигрирующий вариант регионов LG2 и LG7, что явно указывает на происхождение кильдинской трески от мигрирующего экотипа, т.е. наиболее, вероятно, что она произошла от

мигрирующей баренцевоморской трески. Тем самым мы опровергли априори казавшуюся весьма вероятной гипотезу о происхождении трески озера Могильное от прибрежной трески. Этому положению не противоречит то, что у кильдинской трески наблюдается полиморфизм по LG1, поскольку в баренцевоморской популяции этот регион также полиморфен (Berg *et al.*, 2016). Поскольку эффективная численность озерной трески невелика, вероятно, что отличие кильдинской трески от морской по частотам вариантов региона LG1 обусловлено генетическим дрейфом.

Стоит отметить, что другая хорошо изученная озерная популяция трески из озера Огак, Баффинова земля (Канада), также мономорфна по мигрирующему варианту LG2 и LG7 (Bradbury *et al.*, 2014) и, вероятно, также произошла от мигрирующего экотипа.

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. В результате моделирования разделения озерной популяции от морской методами приближенных байесовских вычислений (таблица 3.3, рисунок 3.14) было показано, что вероятное время дивергенции данных популяций – 330 поколений. Если считать длину поколения трески 5-6 лет (Мухина и др., 2002, «Реликтовое озеро...» 1975), то получается, что треска из озера Могильное отделилась от морской популяции около 1800 лет назад (таблица 3.3). Данная оценка согласуется с геологической датировкой отделения озера Могильное от Баренцева моря (1000-2000 лет назад; Гуревич, Лийва, 1975; Mityaev *et al.*, 2008). На протяжении всего этого периода кильдинская треска была полностью репродуктивно изолирована от морской популяции.

## 4.2. Генетическая дивергенция озерной и морской трески

В данной работе кильдинская выборка обозначается как «озерная», а все остальные выборки глобально относятся к общей морской популяции трески, и соответственно обозначаются как «морские» (не учитывая группировки). 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. 3.14) и анализ главных компонент (рис. 3.10) показали, что все исследуемые особи разделяются на две группы: озерную и морскую. При оценке молекулярной изменчивости при разделении всех особей трески на две данные группы было показано, что доля межгрупповой изменчивости составила 41%, это достаточно большое значение для трески: например, доля межгрупповой изменчивости между треской Баренцева и Белого морей составила всего 3%.

При анализе дифференциации морских выборок (KS11, KS12, BS12, WS12 таблица) и озерных (MOG00, MOG11, MOG12) по микросателлитным данным (таблица 3.2, рисунок 3.11) было показано следующее:

- 1) между выборками кильдинской трески разных лет нет дифференциации;
- 2) имеется статистически 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 небольшая, но статистически значимая подразделенность, за исключением парных сравнений 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 (рисунок 3.3), что совпадает с оценками по микросателлитным данным.

Тот факт, что в геномных регионах, показывающих значимую дифференциацию между озерной и морской треской, и регионах, обладающих повышенной изменчивостью, не было обнаружено преобладающих функциональных групп генов (по аннотации Gene Ontology), может быть связано с тремя факторами. Во-первых, вероятно, утрата разнообразия и фиксация определенных вариантов в озерной популяции во многом происходила случайно, под действием генетического дрейфа. Во-вторых, полученные нами молекулярно-генетические данные по геномам трески, вероятно, в данном случае не обладают достаточной разрешающей способностью необходимой для выявления перепредставленных функциональных классов из-за неравномерности покрытия и использования пулов особей, что не позволяет проводить точные оценки частот вариантов в популяции (Schlötterer *et al.*, 2014). Качество сборки и аннотации референсного генома трески, доступное на момент проведения данной работы (*gadMor1*, Star *et al.*, 2011), было недостаточно высоким, поэтому некоторые кодирующие регионы и группы генов не были аннотированы (Tørgesen *et al.*, 2016).

В популяции кильдинской трески при анализе фрагментов митохондриальной ДНК *ND2/tRNA-Trp/tRNA-Ala* и *cytB* не было выявлено изменчивости, все особи имели одинаковый гаплотип. В морской же популяции данные регионы были достаточно изменчивы (гаплотипическое разнообразие 0.8-0.9, нуклеотидное – более 0.7, таблица 3.5). Однако озерный гаплотип отличался от генетически наиболее близкого гаплотипа морской трески всего на одну замену (рисунок 3.16); не исключено, что озёрный гаплотип может быть представлен в морской популяции, но только с крайне низкой частотой, хотя также не исключено, что эта замена независимо возникла в озерной популяции. Вследствие наследования митохондриальной ДНК по материнской линии, эффективная численность популяции при анализе филогении по мтДНК отражает эффективную

численность гаплоидного набора у одного пола – самок, и потому при равном соотношении самцов и самок в популяции, 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 гораздо 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.

### **4.3. 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). Изолированные озерные популяции трески других озер также характеризуются небольшой численностью, около нескольких тысяч, и сокращенным генетическим разнообразием (Patriquin 1967; Hardie *et al.*, 2006, 2008). Эффективная численность трески озера Могильное не превышает одну-две сотни особей. И хотя некоторые гидрохимические характеристики озера Могильное менялись за последние 100 лет (Strelkov *et al.*, 2014), видимо состояние озера изменялось постепенно и потому не повлияло на эффективную численность трески озерной популяции, поскольку по нашим данным долговременная эффективная численность не сильно отличается от эффективной численности в настоящее время. Оценки  $N_e$  сильно варьируют у морских популяций, от нескольких тысяч в популяциях из открытого моря (Therkildsen *et al.*, 2010), до нескольких сотен во фьордовых популяциях (Knutsen *et al.*, 2011), также есть сведения о сильных временных колебаниях эффективной численности

трески (Olafsdottir *et al.*, 2014). Тем не менее, согласно нашей оценке долговременная эффективная численность баренцевоморской популяции составляет несколько десятков тысяч особей, т.е. превосходит  $N_e$  кильдинской трески на два порядка (таблица 3.3). Таким образом, кильдинская треска – это действительно предельно малая популяция по сравнению с громадными популяциями морской трески. При этом отношение  $N_e/N$  (где  $N$  – это число половозрелых особей в популяции) у трески озера Могильное намного выше, чем  $N_e/N$  в морских популяциях (Arnason 2004; Palstra, Fraser 2012; Frankham *et al.*, 2014).

При анализе демографической истории кильдинской трески было показано, что у нее не наблюдается отклонения от мутационно-дрейфового равновесия и увеличения доли гетерозигот (рисунок 3.15, таблица 3.4) и, следовательно, не происходило резкого сокращения (или увеличения) численности в недавнем прошлом.

#### **4.4. 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 (таблица 3.1), т.е. в озерной популяции она снижена почти в три раза по сравнению со средней оценкой для исследованных нами морских популяций. И хотя все аллели микросателлитных локусов озерной трески представлены в морской популяции, их мильтилокусное сочетание, возможно, уникально для кильдинской трески. Среднее внутривидовое разнообразие у кильдинской трески было низкое по всему геному (рисунок 3.1) и равнялось 0.0012, что в четыре раза меньше, чем у морских выборок из Баренцева моря (NEAC) и норвежских фьордов (NCC), оцененное в работе Карлсена (Karlsen *et al.*, 2013). Таким образом, можно заключить, что генетическое разнообразие кильдинской трески меньше, чем у морской трески, в 3-4 раза.

Заключая разделы 4.2-4.4, укажем на 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 цензусную 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 полная длительная репродуктивная изоляция кильдинской трески привели к тому, что ее генетическое разнообразие 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.

#### **4.5. Поиск геномных регионов, находящихся под отбором у кильдинской трески**

Для общей оценки характера происходящих у кильдинской трески популяционно-генетических процессов была использована статистика D (Tajima, 1989), которая показала, что большая часть полиморфизмов у кильдинской трески носит нейтральный характер (рисунок 3.2). Данная статистика не использовалась для поиска конкретных локусов, находящихся под отбором, поскольку она может дать большое количество ложноположительных результатов из-за чувствительности к таким демографическим событиям как бутылочное горлышко,

эффект основателя и т.п. (Schmidt, Pool, 2002). Поэтому поиск геномных регионов, находящихся под направленным отбором, проводился с помощью т.н. скрытых марковских моделей (hidden Markov model, HMM), однако и с его помощью не было найдено ни одного такого региона. Вероятно, в настоящее время в популяции кильдинской трески нет направленного отбора. Поскольку в этом анализе используются данные по изменчивости геномных регионов, анализ осложнялся тем, что референс трески *gadMor1* сильно фрагментирован (Star *et al.*, 2011). Вероятно, что на начальных этапах эволюции кильдинской трески происходил отбор, связанный с адаптацией к условиям обитания; но на последующих этапах отбор был незначителен по величине и потому не обнаруживается. 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.

Было установлено, что тринадцать из пятнадцати использованных микросателлитных локусов, находятся около или даже внутри белок-кодирующих генов (ПРИЛОЖЕНИЕ, таблица 4), и потенциально могут быть ассоциированы с адаптивными процессами. Действительно, имеются указания на то, что некоторые микросателлитные локусы находятся под отбором из-за фоновой селекции, процесса «автостопа» (Kashi, King 2006; Selkoe, Toonen, 2006). При проверке нейтральности микросателлитных маркеров нами было показано, что при сравнении популяций трески Баренцева и Белого морей выявляются локусы, которые, вероятно, были вовлечены в процессы отбора в ходе дивергенции этих популяций (рисунок 3.7, А и 3.8, А). Однако, при сопоставлении выборок трески из Баренцева моря и озера не было обнаружено никаких отклонений от ожидаемого распределения, что указывало на селективную нейтральность всех использованных нами маркеров, обусловленную превалированием генетического дрейфа над другими популяционно-генетическими процессами в предельно малой популяции трески озера Могильное (рисунок 3.7 Б, 3.8 Б).

#### **4.6. Инбредная депрессия и генетический груз**

В настоящее время считается, что для краткосрочного сохранения популяции и отсутствия инбредной депрессии эффективная численность должна быть не менее ста особей, а для сохранения эволюционного потенциала – не менее тысячи особей (Frankham *et al.*, 2014). Эффективная численность кильдинской трески близка к нижней критической отметке. Несмотря на то, что популяция кильдинской трески живёт в таких условиях уже более полутора тысяч лет, ни по одному из исследованных нами локусов нет значимого отклонения от равновесия Харди-Вайнберга (ПРИЛОЖЕНИЕ, таблица 3). Для анализа уровня генетического груза в популяции мы оценили число мутаций, приводящих к потере функции белка, нами не было обнаружены изменения уровня мутаций данного типа в озерной популяции по сравнению с морской. Однако, из-за небольшого количества данных, качества референсного генома и того, что мы использовали смешанные образцы, на основании данных результатов нельзя сделать достоверный вывод о соотношении уровней подобных мутаций у кильдинской и морской трески.

#### **4.7. Стратегия сохранения кильдинской трески**

Существует много точек зрения по вопросу о том, какие популяции требуют принятия специальных мер по их сохранению. В работе Ваплса (Waples, 1991) предложено два критерия отбираются популяция, для которых требуется принимать меры по сохранению: (1) эти популяции должны быть репродуктивно изолированы от остальных представителей вида и (2) представлять собой важный эволюционный компонент вида. Также желательно уделять внимание популяциям, которые по молекулярным данным сильнее всего подразделены от других популяций (Moritz *et al.*, 1995). Для популяций тихоокеанских лососей, находящихся на грани исчезновения (Allendorf *et al.*, 1997) было предложено два критерия для выбора приоритетных популяций для проведения природоохранных мер: (1) эти популяции могут исчезнуть и (2) при их исчезновении могут

возникнут серьёзные экологические и эволюционные последствия. Для популяций морских видов был предложен подход (Nielsen, Kenchington 2001), который учитывает такие важные популяционные параметры, как количество особей в популяции, эффективная численность, жизненный цикл, достаточную плотность популяции для размножения.

Хотя все описанные выше критерии не были разработаны специально для малых популяций, они частично могут быть применены для популяции кильдинской трески. Нами было показано, что озерная треска репродуктивно изолирована от морской популяции трески, значительно отличается от нее по молекулярно-генетическим маркерам, а также достигла минимальной критической эффективной и фактической численности. Кроме того, кильдинская треска обладает уникальными морфологическими, физиологическими, поведенческими особенностями (Mukhina *et al.*, 2002), однако, остается неизвестным, данные особенности обусловлены фенотипической пластичности трески как вида, либо специфичными адаптациями кильдинской трески к окружающей среде; вероятно, данный вопрос может быть разрешен только экспериментальным способом (Дерюгин, 1920). При изучении изолированных и полуизолированных популяций трески, в том числе их меромиктических озер, Харди (Харди и др., 2008) отметил, что данные малые популяции являются важным компонентом внутривидового разнообразия.

Таким образом 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).

Первая мера необходима для защиты места обитания, а вторая – для сохранения генофонда кильдинской трески. В настоящее время озеро Могильное является памятником природы, а кильдинская треска занесена в Красную книгу России (Шилин 2001), что частично обеспечивает её защиту. Предлагаемая стратегия сохранения популяции трески оз. Могильное учитывает её генетические и экологические особенности, сводя к минимуму риски для данной популяции. Подобная стратегия может быть применена и для других малых изолированных популяций, в частности, популяций трески других арктических озёр.

## 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 солености 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.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

в.д. – восточная долгота;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

мМ – микромоль;

мкг/мл – микрограмм на мл;

мкл – микролитр;

млн.н. – миллионы нуклеотидов;

мтДНК – митохондриальная ДНК;

н.э. – наша эра;

нг – нанограмм;

о. – остров;

оз. – озеро;

п.н. – пары нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

с.ш. – северная широта;

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

AMOVA – Analysis of Molecular Variance, анализ молекулярной изменчивости;

PCA – Princopal Component Analysis, анализ главных компонент;

PCoA – Principar Coordinate Analysis, анализ главных координат;

SNP – single nucleotide polymorphism, однонуклеотидные замены;

TBE – Tris/Borate/EDTA, Трис-борат-ЭДТА ;

UTR (5'-UTR, 3'-UTR) – untraslated region, нетранслируемый регион гена.

## СПИСОК ТЕРМИНОВ

**Амплификация:** процесс увеличения количества определенного фрагмента ДНК с помощью полимеразной цепной реакции.

**Дедупликация:** этап биоинформатической обработки полногеномных данных, процесс уменьшения количество одинаковых последовательностей-дублей, полученных при ПЦР во время подготовки геномных библиотек для секвенирования второго поколения.

**Депрессия:** геоморфологический термин, понижение на земной поверхности.

**Дефолтные параметры:** предустановленные параметры программ.

**Инделлы:** вставки и выпадения нуклеотидов.

**Меромиктический водоем:** водоем, у которого практически нет циркуляции воды, как правило, стратифицированные водоемы.

**Островки дивергенции, или «геномные островки видообразования»:** геномные регионы, которые показывают наибольшую дивергенцию между видами, подвидами, расами, морфами и т.п.

**Праймер:** небольшой олигонуклеотидный фрагмент ДНК, который используется для полимеразной цепной реакции.

**Скаффолд:** объединенные контиги, т.е. фрагменты ДНК, полученные при сборке генома, один из этапов сборки генома.

**Фланкирующие регионы:** смежные регионы.

**Цензусная численность:** действительная (фактическая) численность популяции.

**Экотип:** генетическая отличная от других разновидность (морфа), обладающая определенными экологическими, поведенческими, морфологическими характеристиками.

**Эндемик:** вид (подвид) растения/животного, проживающий только в определенном, ограниченном географическом районе.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Бойцов В.Д. Треска Баренцева моря: биология и промысел. / В.Д. Бойцов, Н.И. Лебедь, В.П. Пономаренко, И.Я. Пономаренко, В.В. Терещенко, В.Л. Третьяк, М.С. Шевелев, Н.А. Ярагина. – Мурманск: Изд-во ПИНРО, 2003. – 296 с.
2. Галкин Ю.И. Моллюски. / Ю.И. Галкин // Реликтовое озеро Могильное. Л.: Изд-во Наука, 1975. – С.173-184.
3. Гуревич В.И. Рельеф, батиметрия, морфометрия/ В.И. Гуревич // Реликтовое озеро Могильное. Л.: Изд-во Наука, 1975. – С.18-22.
4. Гуревич В.И. 1975. Возраст оз. Могильного / В.И. Гуревич, А.А. Лийва // Реликтовое озеро Могильное. Л.: Наука, 1975. – С. 102–104.
5. Дерюгин К.М. Новая форма трески из озера Могильного/ К.М. Дерюгин // Труды Пертергоф., об-ва естествоисп. – 1920. – Т. 51. – Вып. 1. – С. 26-28.
6. Дерюгин К.М. Реликтовое озеро Могильное / К.М. Дерюгин // Труды Пертергоф. естеств.-научного ин-та. – 1925а. – №2. – 98с.
7. Макеенко Г. Полиморфизм локуса *Ran I* в популяции северо-восточной арктической трески *Gadus morhua* L.(*Gadiformes: Gadidae*) в Баренцевом море и смежных водах / Г. Макеенко, А. Волков, Н. Мюге, Д. Зеленина // Генетика. – 2014. – Т. 50. – № 12. – С.1425.
8. Мухина Н.В. Биологическое состояние кильдинской трески / Н.В. Мухина, Н.А. Лепесевич, Е.А. Филина // Реликтовое озеро Могильное, Мурманск: Изд-во ПИНРО, 2002. – С.88-110.
9. Новиков Г.Г. Морфобиологическая характеристика кильдинской трески / Г.Г. Новиков, А.Н. Строганов, В.С. Виноградский // Тр. Беломор. биол. станции МГУ. – 2006б. – Т. 10. – С.110–116.

10. Новиков Г.Г. О сходстве и различиях трески Белого и Баренцева морей / Г.Г. Новиков, А.Н. Строганов, М.А. Зюзина // Тр. Беломорск. биол. ст. МГУ. - 2002. – Т. 8. – С. 154–164.
11. Новиков Г.Г., Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Строганов А.Н. 2006а. О некоторых генетических пара метрах кильдинской трески *Gadus morhua kildinensis* Derugin (*Gadidae*, *Gadiformes*) / Г.Г. Новиков, К.И. Афанасьев, Г.А. Рубцова, А.Н. Строганов // Вопр. ихтиологии. – 2006а – Т. 46. – № 5. – С. 708–710.
12. Победоносцев С.В. Современные вертикальные движения берегов Белого и Баренцева морей / С.В. Победоносцев, Л.Л. Розанов // Геоморфология. –1971. – Т. 3. – С.57-62.
13. Пономаренко В.П., О миграциях трески в прибрежные воды Новой Земли / В. П. Пономаренко // Океанология. . – 1994.. – Т. 34. – № 1 . – С. 95–101.
14. Реликтовое озеро Могильное. Л.: Изд-во Наука, 1975. – 250 с.
15. Реликтовое озеро Могильное (исследования 1997–2000 гг.). Мурманск: Изд-во ПИНРО, 2002. – 163 с.
16. Ретовский Л.О. Наблюдения над морскими ваннами Мурманского побережья / Л.О Ретовский // Труды Арктического ин-та. – 1933. – Т. 3. – № 2. – С. 30-35.
17. Световидов А.Н. Трескообразные / А.Н. Световидов // Фауна СССР. Рыбы. – 1948. – Т.9. – В.4. – М.-Л.:Изд-во АН СССР,. – 221с.
18. Строганов А.Н. Данные по изменчивости микросателлитных локусов у кильдинской трески *Gadus morhua kildinensis* (*Gadidae*) / А.Н. Строганов, К.И. Афанасьев, Рубцова Г.А., Ракицкая Т.А., Семенова А.В. // Вопросы ихтиологии. – 2011. – Т. 51. – №4. – С. 459-466.

19. Строганов А.Н. Данные по изменчивости микросателлитных локусов у кильдинской трески *Gadus morhua kildinensis* (*Gadidae*) / А.Н. Строганов, К.И. Афанасьев, Г.А. Рубцова, Т.А. Ракицкая, А.В. Семенова // Вопросы ихтиологии. – 2011. – Т. 51. – №4. – С. 459-466.
20. Строганов А.Н. Особенности биологии кильдинской трески *Gadus morhua kildinensis* Derjugin, 1920 (*Gadidae*) / А.Н.Строганов, Е.А. Криксунов, Н.В. Зуйкова, Н.В. Мухина, В.А. Бурменский, А.В. Семенова, А.М. Шадрин // Биология моря. – 2015. – Т. 41. – № 6. – С. 395-402.
21. Харди Д.С. Изоляция популяций атлантической трески *Gadus morhua* (*Gadiformes*) в северных меромиктических озерах–повторяющийся в Арктике феномен / Д.С. Харди, К.Б. Рено, В.П. Пономаренко, Н.В. Мухина, Н.А. Ярагина, Й.Е. Шеросен, Д.А. Хатчингс// Вопр. ихтиологии. 2008. – Т. 48. – № 2. – С. 179–190.
22. Цееб Р.Я. *Gadus morhua kildinensis* Derjugin/ Р.Я. Цееб // Реликтовое озеро Могильное. Л.: Изд-во Наука , 1975а. – С.220-223.
23. Цееб Р.Я. Возраст и рост / Р.Я. Цееб // Реликтовое озеро Могильное. Л.: Изд-во Наука , 1975б. – С.247-250.
24. Цееб Р.Я. Морфология кильдинской трески/ Р.Я. Цееб, А.В. Астафьева // Реликтовое озеро Могильное. Л.: Изд-во Наука, 1975. – С.259-276.
25. Цееб Р.Я. Питание / Р.Я. Цееб // Реликтовое озеро Могильное. Л.: Изд-во Наука , 1975в. – С.250-258.
26. Цееб Р.Я. Размножение/ Р.Я. Цееб, Ю.С. Поздняков // Реликтовое озеро Могильное. Л.: Изд-во Наука , 1975. – С.227-247.
27. Шилин Н.И. Кильдинская треска *Gadus morhua kildinensis* Derugin, 1920/ Н.И. Шилин // Красная книга Российской Федерации. Животные. М.: АСТ Астрель, 2001 – С. 308.

28. Agrawal A.A. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species / A.A. Agrawal // *Science*. – 2001. – V. 294. – № 5541. – P.321-326.
29. Alexa A. topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R package version 2.24.0. / A. Alexa, J. Rahnenfuhrer / – 2016
30. Allendorf F.W. Conservation and the genetics of populations/ F.W. Allendorf, G. Luikart, S.N. Aitken – Wiley, Hoboken. – 2012.
31. Andreev V. Long-term persistence and evolutionary divergence of a marine fish population with a very small effective population size (Kildin cod *Gadus morhua kildinensis*) / V. Andreev, M. Fokin, N. Mugue, P. Strelkov// *Marine Biology*. – 2015. – V. 162. – №5. – P.979-992.
32. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data / S. Andrews // 2010. - URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (дата обращения 1.09.2016)
33. Antao T. LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method / T. Antao, A. Lopes, R.J. Lopes, A. Beja-Pereira, G. Luikart // *BMC Bioinform.* – 2008. – V. 9. – P.323
34. Arnason E. Intense habitat-specific fisheries-induced selection at the molecular Pan I locus predicts imminent collapse of a major cod fishery / E. Arnason, U.B. Hernandez, K. Kristinsson // *PLoS One*. – 2009. – V. 4. – № 5. – p.e5529.
35. Arnason E. Nucleotide variation and balancing selection at the *Ckma* gene in Atlantic cod: analysis with multiple merger coalescent models / E. Arnason, K. Halldorsdottir // *PeerJ*. – 2015 . – V.3. – e786.
36. Arnason R. Optimal feedback controls: comparative evaluation of the cod fisheries in Denmark, Iceland, and Norway/ R. Arnason, L.K. Sandal, S.I. Steinshamn, N. Vestergaard// *American Journal of Agricultural Economics*. – 2004. – V. 86. – № 2. – P.531-542.
37. Arnold S.J. The adaptive landscape as a conceptual bridge between micro- and macroevolution /S.J. Arnold, M.E. Pfrender, A.G Jones// *Genetica*. – 2001. – V.112. – №1. – P.9-32.

38. Aronesty E. ea-utils : Command-line tools for processing biological sequencing data / E. Aronesty// - 2011. URL: <https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils> (дата обращения 1.09.2016)
39. Asgharian H. Evolutionary genomics of *Culex pipiens*: global and local adaptations associated with climate, life-history traits and anthropogenic factors / H. Asgharian, P.L. Chang, S. Lysenkov, V.A. Scobeyeva, W.K. Reisen, S.V. Nuzhdin // Proc. R. Soc. B. – 2015. – V. 282. – №1810. –P. 20150728.
40. Balloux F. Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size / F. Balloux // Evolution. –2004. – V. 58. – P.1891-1900.
41. Beaumont M.A. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure / M.A. Beaumont, R.A. Nichols // Proc R Soc Lond Ser B. –1996. – V. 263 – P.1619–1626.
42. Belkhir K. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations / K. Belkhir, P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, F. Bonhomme // Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France) –1996-2004.
43. Benson D.A. GenBank / D.A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, E.W. Sayers //Nucleic Acids Res. – 2009. – V. 37. – D26-31.
44. Berg E. Cod in fjords and coastal waters of North Norway: distribution and variation in length and maturity at age / E. Berg, O.T. Albert // ICES J Mar Sci. – 2003. – V. 60. – P. 787–797
45. Berg P.R. Adaptation to low salinity promotes genomic divergence in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) / P.R. Berg, S. Jentoft, B. Star, K.H. Ring, H. Knutsen, S. Lien, K.S. Jakobsen, C. Andre // Genome Biol. Evol. –2015. – V.7. – № 6. – P.1644-1663.
46. Berg P.R. Three chromosomal rearrangements promote genomic divergence between migratory and stationary ecotypes of Atlantic cod / P.R. Berg, B. Star, C. Pampoulie, M. Sodeland, J.M. Barth, H. Knutsen, K.S. Jakobsen, S. Jentoft // Scientific reports. – 2016. – A.6.

47. Birky C.W. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes / C.W. Birky, P. Fuerst, T. Maruyama // *Genetics*. – 1989. – V. 121. – № 3. – P. 613-627.
48. Boitard S. Pool-hmm: a Python program for estimating the allele frequency spectrum and detecting selective sweeps from next generation sequencing of pooled samples / S. Boitard, R. Kofler, P. Françoise, D. Robelin, C. Schlötterer, A. Futschik // *Mol Ecol resources*. – 2013. – V.13. – №2. – P.337-340.
49. Bradbury I.R. Parallel adaptive evolution of Atlantic cod on both sides of the Atlantic Ocean in response to temperature / I.R. Bradbury, S. Hubert, B. Higgins, T. Borza, S. Bowman, I.G. Paterson, P.V. Snelgrove, C.J. Morris, R.S. Gregory, D.C. Hardie, J.A. Hutchings // *Proc. of the Royal Soc. of London B: Biol Sci.* – 2010. – V. 277. – № 1701. – P. 3725-3734.
50. Bradbury I.R. Long Distance Linkage Disequilibrium and Limited Hybridization Suggest Cryptic Speciation in Atlantic Cod / I.R. Bradbury, S. Bowman, T. Borza, P.V.R. Snelgrove, J.A. Hutchings, P.R. Berg, N. Rodríguez-Ezpeleta, J. Lighten, D.E. Ruzzante, C. Taggart, P. Bentzen // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9. – № 9. – e106380.
51. Brander K.M. The effect of temperature on growth of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) / K.M. Brander // *ICES J Mar Sci.* – 1995. – V. 52. – P. 1–10.
52. Caddy J. A review of fisheries management past and present and some future perspectives for the third millennium/ J. Caddy, K. Cochrane, // *Ocean & Coastal Manag.* – 2001. – V. 44. –P. 653–682.
53. Carlsson J. Rapid, economical single-nucleotide polymorphism and microsatellite discovery based on de novo assembly of a reduced representation genome in a non-model organism: a case study of Atlantic cod *Gadus morhua* / J. Carlsson, D.T. Gauthier, J.E.L. Carlsson, J.P. Coughlan, E. Dillane, R.D. Fitzgerald, U. Keating, P. McGinnity, L. Mirimin, T.F. Cross // *Journal of Fish Biology*. – 2013. – V. 82. –P.944-958.

54. Case R.A.J. Macro-and micro-geographic variation in pantophysin (PanI) allele frequencies in NE Atlantic cod *Gadus morhua* / R.A.J. Case, W.F. Hutchinson, L. Hauser, C. Van Oosterhout, G.R. Carvalho// *Marine Ecology Progress Series*. – 2005. – V. 301. – P. 267-278.
55. Cingolani P. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3 / P. Cingolani, A. Platts, L.L. Wang, M. Coon, T. Nguyen, L. Wang, S.J. Land, X. Lu, D.M. Ruden // *Fly*. – 2012. – V. 6. – № 2. – P.80-92.
56. Cornuet J.M. Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v. 1.0) / J.M. Cornuet, V. Ravigne', A. Estoup // *BMC Bioinform.* – 2010. – V. 11. – P.401
57. Danecek P. The variant call format and VCFtools / P. Danecek, A. Auton, G. Abecasis, C.A. Albers, E. Banks, M.A. DePristo, R.E. Handsaker, G. Lunter, G.T. Marth, S.T. Sherry, G. McVean// *Bioinformatics*. – 2011. – V. 27. – №15. – P.2156-2158.
58. Delghandi M. Twenty-three novel microsatellite markers developed from Atlantic cod *Gadus morhua* L. expressed sequence tags / M. Delghandi, M.S. Wesmajervi, T. Tafese, F. Nilsen // *Journal of Fish Biology*. – 2008. – V.73. – P. 444-449.
59. Do C. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size ( $N_e$ ) from genetic data / C. Do , R.S. Waples, D. Peel, G.M. Macbeth, B.J. Tillett, J.R. Ovenden // *Mol Ecol Res.* – 2014. – V. 14. – №1. – P.209-214.
60. Dunbar M. J. Physical Oceanographic Results of the “Calanus” Expeditions in Ungava Bay, Frobisher Bay, Cumberland Sound, Hudson Strait and Northern Hudson Bay, 1949–1955 / M. J. Dunbar // *J. Fish. Res. Board Can.* – 1958. – V.15. –№ 2. –P. 155–201.

61. Durinck S. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt / Durinck S, Spellman P, Birney E and Huber W // Nature Protocols. 2009. – V. 4. – P.1184–1191.
62. Earl D.A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D.A. Earl // Conservation genetics resources. – 2012. – V. 4. – № 2. – P. 359-361.
63. Eiriksson G.M. Spatial and temporal microsatellite variation in spawning Atlantic cod, *Gadus morhua*, around Iceland / G.M. Eiriksson, E. Arnason // Canadian J of Fish and Aqua Sci. – 2013. – V. 70. – P. 1151–1158.
64. Eyre-Walker A. The distribution of fitness effects of new mutations / A. Eyre-Walker, P.D. Keightley // Nature Reviews Genetics. – 2007. –V. 8. – № 8. – P.610-618.
65. Fevolden S.E. Settling-depth vs. genotype and size vs. genotype correlations at the Pan I locus in 0-group Atlantic cod *Gadus morhua* / S.E. Fevolden, J-I. Westgaard, T. Pedersen, K. Præbel // Marine Ecol Progr Ser, 2012 – V. 468. – P. 267–278.
66. Fisher R.A. The genetical theory of natural selection: a complete variorum edition / R.A. Fisher. – Oxford University Press. – 1930.
67. Foll M. A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective / M. Foll, O.E. Gaggiotti // Genetics. – 2008. – V. 180. – P.977-993.
68. Frankham R. Genetics and conservation biology / R. Frankham // Comptes Rendus Biologies. – 2003. – V. 326. – P.22-29.
69. Frankham R. Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses / R. Frankham, C.J. Bradshaw, B.W. Brook // Biological Conservation. – 2014. – V. 170. – P.56-63.
70. Frankham R. Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability

- analyses / R. Frankham, C.J.A. Bradshaw, B.W. Brook // *Biol Conserv.* – 2014. – V. 170. – P.56–63.
71. Franklin I.R. Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective / I.R. Franklin, M.E. Soule, B.A. Wilcox // Sinauer, Sunderland, MA. – 1980. – p.1351-1350.
72. Franklin I.R. Evolutionary change in small populations / I.R. Franklin // *Conserv Biol: an evol-ecol perspect.* – 1980. –P.135-149.
73. Gabriel W. Survival of small populations under demographic stochasticity / W. Gabriel, R. Burger // *Theor Popul Biol.* – 1992. – V. 41. – № 1. – P.44-71.
74. Garrison E. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing / E. Garrison, G. Marth // arXiv preprint arXiv:1207.3907 [q-bio.GN]. – 2012
75. Grabowski T.B. Evidence of segregated spawning in a single marine fish stock, sympatric divergence in Icelandic cod? / T.B. Grabowski, V. Thorsteinsson, B. J. McAdam, G. Marteinsdottir // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – e17528.
76. Gulliksen B., Svensen E. Svalbard and Life in Polar Oceans / Gulliksen B., Svensen E. – Kristiansund: Komforlag. – 2004.
77. Harden J.F.R. Fish migrations/ J.F.R. Harden //Edward Arnold (Publishers). London. – 1968. – 325 p.
78. Hardie D.C. Cannibalistic growth polyphenism in Atlantic cod / D.C. Hardie, J.A. Hutchings // *Evolutionary Ecology Research.* – 2015. – V. 16. – № 7. – P. 569-580.
79. Hardie D.C. The ecology of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in Canadian Arctic lakes/ D.C. Hardie, J.A. Hutchings // *Arctic.* 2011. – P.137-150.
80. Hardie D.C. The effects of isolation and colonization history on the genetic structure of marine-relict populations of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Canadian Arctic / D.C. Hardie, R.M. Gillett, J.A. Hutchings // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 2006. – V. 63. – № 8. – P. 1830–1839.

81. Hilbish T.J. Population genetics of marine species: the interaction of natural selection and historically differentiated populations / T.J. Hilbish // *J of Exper Marine Biol Ecol.* – 1996. – V. 200. – № 1. –P.67-83.
82. Hutchings J. A. Collapse and recovery of marine fishes / J. A Hutchings // *Nature.* – 2000. – V. 406. – P. 882–885.
83. Hutchings J.A. Marine fish population collapses: consequences for recovery and extinction risk / J.A. Hutchings, J.D. Reynolds // *BioScience.* – 2004. – V. 54. – № 4. – P.297-309.
84. Hutchinson W.F. Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in declining North Sea cod (*Gadus morhua*) / W.F. Hutchinson, C. van Oosterhout, S.I. Rogers, G.R Carvalho // *Proc of the Royal Soc of London B: Biological Sciences.* – 2003. – V.270. – № 1529. – P.2125-2132.
85. Jakobsdottir K.B. Nine new polymorphic microsatellite loci for the amplification of archived otolith DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua* L / K.B. Jakobsdottir, S. Skirnisdottir, S. Hjorleifsdottir, G.O. Hreggvidsson, A.K. Danielsdottir, C. Pampoulie // *Molecular Ecology Notes.* – 2006. – V. 6. – P. 337-339.
86. Karlsen B.O. Genomic divergence between the migratory and stationary ecotypes of Atlantic cod / B.O. Karlsen, K. Klingan, A. Emblem, T.E. Jorgensen, A. Jueterbock, T. Furmanek, G. Hoarau, S.D. Johansen, J.T. Nordeide, T. Moum // *Molecular Ecology.* – 2013. – V. 22. – P. 5098–5111.
87. Kashi Y. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution / Y. Kashi, D.G. King // *Trends Genet.* – 2006. – V. 22. – P.253–259.
88. Kearse M. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data / M. Kearse, R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies, A. Drummond // *Bioinformatics.* – 2012. – V. 28. – №12. – P.1647-1649.
89. Kennedy C. Cannibal Cod in an Arctic Lake/ C. Kennedy// *Nat.Hist.* –1953 – V. 62. –№ 2. – P. 78–82.

90. Kimmel M. Signatures of population expansion in microsatellite repeat data / M. Kimmel, R. Chakraborty, J.P. King, M. Bamshad, W.S. Watkins, L.B. Jorde // *Genetics*. – 1998. – V. 148. – P. 1921–1930.
91. Kimura M. The mutation load in small populations / M. Kimura, T. Maruyama, J.F. Crow // *Genetics*. – 1963. – V. 48. – № 10. – P.1303.
92. Kimura M. The mutational load with epistatic gene interactions in fitness / M. Kimura, T. Maruyama // *Genetics*. –1966. – V. 54. – №6. – P.1337.
93. Kirubakaran T.G. Two adjacent inversions maintain genomic differentiation between migratory and stationary ecotypes of Atlantic cod / T.G. Kirubakaran, H. Grove, M.P. Kent, S.R. Sandve, M. Baranski, T. Nome, M.C. De Rosa, B. Righino, T. Johansen, H. Ottera, A. Sonesson // *Mol. Ecol.* – 2016. –V. 25. – № 10. – P. 2130–2143.
94. Kliman R. Genetic drift and effective population size / R. Kliman, B. Sheehy, J. Schultz // *Nature Education*. – 2008. – V. 1. – № 3. – P.3.
95. Knutsen H. Are low but statistically significant levels of genetic differentiation in marine fishes ‘biologically meaningful’? A case study of coastal Atlantic cod / H. Knutsen, E.M. Olsen, P.E. Jorde, S.H. Espeland, C. Andre, N.C. Stenseth // *Mol Ecol*. – 2011. – V. 20. – № 4. – P.768-783.
96. Kofler R. PoPoolation: A Toolbox for Population Genetic Analysis of Next Generation Sequencing Data from Pooled Individuals / R. Kofler, P. Orozco-terWengel, N. De Maio, R.V. Pandey, V. Nolte, A. Futschik, C. Kosiol, C. Schlötterer // *PLoS ONE*. – 2011a. – V. 6. – №1. – P.e15925
97. Kofler R. PoPoolation2: identifying differentiation between populations using sequencing of pooled DNA samples (Pool-Seq) / R. Kofler, R.V. Pandey, C. Schlötterer // *Bioinformatics*. – 2011b. – V. 27. – №24. – P.3435-3436.
98. Krebs C.J. *Ecological methodology/* C.J. Krebs. - Benjamin/ Cummings, Menlo Park, 2nd edn. – 1999.
99. Kurlansky M. *Cod. A Biography of the Fish That Changed the World/* M. Kurlansky – Toronto: Alfred A. Knopf. – 1997.

100. Lande R. Effective population size, genetic variation, and their use in population management / R. Lande, G.F. Barrowclough // *Viable Popul Conserv.* – 1987. – P.87-123.
101. Langmead B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. Salzberg // *Nature Methods.* – 2012. – V. 9. – P.357-359.
102. Le Bris A. Evidence for alternative migratory behaviours in the northern Gulf of St Lawrence population of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) / A. Le Bris, A. Frechet, P.S. Galbraith, J.S. Wroblewski // *ICES Jour. of Marine Sci.: Journal du Conseil.* – 2013. – V. 70. – № 4. – P.793-804.
103. Lee A.P. Ancient vertebrate conserved noncoding elements have been evolving rapidly in teleost fishes / A.P. Lee, S.Y. Kerk, Y.Y. Tan, S. Brenner, B. Venkatesh // *Molecular biology and evolution.* – 2011. – V. 28. – №3. – P.1205-1215.
104. Lewis P.O. Genetic data analysis. Computer program for the analysis of allelic data/ P.O. Lewis, D. Zaykin // – 2001. – URL: <http://phylogeny.uconn.edu/software/> (дата обращения 1.09.16)
105. Li H. The sequence alignment/map format and SAMtools / H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, , G. Abecasis, R. Durbin // *Bioinformatics.* - 2009. – V. 25. – №16. – P.2078-2079.
106. Losos J.B. Adaptation and diversification on islands / J.B. Losos, R.E. Ricklefs // *Nature.* – 2009. – V. 457. – № 7231. – P.830-836.
107. Losos J.B. Experimental studies of adaptive differentiation in Bahamian *Anolis* lizards / J.B. Losos, T.W. Schoener, K.I. Warheit, D. Creer // *Microevolution Rate, Pattern, Process.* – 2001. – P. 399-415.
108. Luikart G. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data / G. Luikart, J.M. Cornuet // *Conservation biology.* – 1998. – V. 12. – №1. – P.228-237.
109. Luikart G. Estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny / G. Luikart, J.M. Cornuet // *Genetics.* – 1999. – V. 151. – P.1211-1216.

110. Lynch M. Mutation accumulation and the extinction of small populations / M. Lynch, J. Conery, R. Burger // *American Naturalist*. – 1995. – P.489-518.
111. Lynch M. Mutation load and the survival of small populations / M. Lynch, W. Gabriel // *Evolution*. –1990. – P.1725-1737.
112. MacArthur D.G. A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes / D.G. MacArthur, S. Balasubramanian, A. Frankish, N. Huang, J. Morris, K. Walter, L. Jostins, L. Habegger, J.K. Pickrell, S.B. Montgomery, C.A. Albers// *Science*. - 2012. – V. 335. - № 6070. – P.823-828.
113. Marshall H.D. Near neutrality, rate heterogeneity, and linkage govern mitochondrial genome evolution in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and other gadine fish / H.D. Marshall, M.W. Coulson, S.M. Carr // *Molecular biology and evolution*. – 2009. – V. 26. – №3. – P.579-589.
114. Marteinsdottir G. Essential relationships incorporating the influence of age, size and condition on variables required for estimation of reproductive potential in Atlantic cod *Gadus morhua* / G. Marteinsdottir, G.A. Begg, // *Marine Ecol Prog Series*. – 2002. –V. 235. – P.235–256.
115. McLaren I. A. Introduction to Biological Studies of Ogac Lake, a Landlocked Fiord on Baffin Island/ I. A McLaren // *J. Fish. Res. Board Can.* – 1967b – V. 24. – № 5. – P.975–980.
116. McLaren I. A. Physical and Chemical Characteristics of Ogac Lake, a Landlocked Fiord on Baffin Island/ I.A. McLaren // *J. Fish. Res. Board Can.* – 1967a. – V. 24. – № 5. – P. 981–1015.
117. Meirmans P.G. AMOVA-based clustering of population genetic data / P.G. Meirmans // *Journal of Heredity*. – 2012. – V. 103. - № 5. – P. 744-750.
118. Miller K.M. Development of tri-and tetranucleotide repeat microsatellite loci in Atlantic cod (*Gadus morhua*) / K.M. Miller, K.D. Le, T.D. Beacham // *Molecular Ecology*. – 2000. – V.9. – P. 238-239.
119. Mityaev M.V. Ancient coastlines of Eastern Kildin / M.V. Mityaev, S.A. Korsun, P.P. Strelkov, G.G. Matishov // *Dokl Earth Sci.* – 2008. – V. 423. – P:1–5.

120. Moritz C. Using allele frequency and phylogeny to define units for conservation and management / C. Moritz, S. Lavery, R. Slade // Nielsen JL, Powers GA (eds). Evolution and the aquatic ecosystem: defining unique units in population conservation Symposium 17. American Fisheries Society, Bethesda. – 1995. – P. 249–262.
121. Nei M. Genetic distances between populations/ M. Nei // American Naturalist. – 1972. – V. 106. – P. 282-292.
122. Nei M. The bottleneck effect and genetic variability in populations / M. Nei, T. Maruyama, R. Chakraborty // Evolution. – 1975. – P.1-10.
123. Nei M. The neutral theory of molecular evolution in the genomic era / M. Nei, Y. Suzuki, M. Nozawa // Annual review of genomics and human genetics. – 2010. – V. 11. – P.265-289.
124. Nielsen E.E. A new approach to prioritizing marine fish and shellfish populations for conservation / E.E. Nielsen, E. Kenchington // Fish Fish. – 2001. – V. 2. – P.328–343.
125. Nomura T. Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample / T. Nomura // Evol Appl. – 2008. – V. 1. – P. 462–474
126. Nordeide J.T. Population connectivity among migratory and stationary cod *Gadus morhua* in the Northeast Atlantic—a review of 80 years of study/ J.T. Nordeide, S.D. Johansen, T.E. Jorgensen, B.O. Karlsen, T. Moum // Marine Ecol. Progr. Series. – 2011. – V. 435. – P. 269-283.
127. O’lafsdóttir G.A. Historical DNA reveals the demographic history of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in medieval and early modern Iceland / G.A. O’lafsdóttir, K.M. Westfall, R. Edvardsson, S. Pa’lsson // Proc R Soc Lond B Biol Sci. – 2014. – V. 281. – №1777 – P:20132976
128. O’Brien, L. Maturation of Nineteen Species of Finfish off the Northeast Coast of the United States, 1985-1990 / L. O’Brien, J. Burnett, R. K. Mayo// NOAA Tech. Report. NMFS. 1993. – V. 113. – 66 p.

129. Olsen E.M. Maturation trends indicative of rapid evolution preceded the collapse of northern cod / E.M. Olsen, M. Heino, G.R. Lilly, M.J. Morgan, J. Brattey, B. Ernande, U. Dieckmann // *Nature*. – 2004. – V. 428. – № 6986. – P.932-935.
130. Palstra F.P. Effective/census population size ratio estimation: a compendium and appraisal / F.P. Palstra, D.J. Fraser // *Ecology and evolution*. – 2012. – V. 2. – № 9. – P.2357-2365.
131. Palstra F.P. Effective/census population size ratio estimation: a compendium and appraisal / F.P. Palstra, D.J. Fraser // *Ecol Evol*. – 2012 – V. 2. – P.2357-2365.
132. Pampoulie C. 2008. Are vertical behaviour patterns related to the pantophysin locus in the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)? / C. Pampoulie, K.B. Jakobsdottir, G. Marteinsdottir, V. Thorsteinsson // *Behavior genetics*. – 2008. – V. 38. – № 1. – P.76-81.
133. Pampoulie C. Are vertical behaviour patterns related to the pantophysin locus in the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)? / C. Pampoulie, K.B. Jakobsdottir, G. Marteinsdóttir, V. Thorsteinsson // *Behavior genetics*. – 2008. – V. 38 – № 1. – P.76-81.
134. Pandey V. Applied Biosystems SOLiD™ System: Ligation-Based Sequencing / V. Pandey, R.C. Nutter, E. Prediger // *Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*Wiley. – 2008. – P. 29-41.
135. Patriquin D.G. Biology of *Gadus morhua* in Ogac Lake, a Landlocked Fiord on Baffin Island / D.G. Patriquin // *J. Fish. Res. Board Can.* – 1967. – V. 24. – № 12. – P. 2573–2594.
136. Peakall R.O.D. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R.O.D. Peakall, P.E. Smouse // *Mol Ecol Notes*. – 2006. – V. 6. – №1. – P.288-295.
137. Pergams O.R. 2009. Recent and widespread rapid morphological change in rodents / O.R. Pergams, J.J. Lawler // *PLoS One*. – 2009. – V. 4. – №7. – P.e6452.

138. Pershing A.J. Slow adaptation in the face of rapid warming leads to collapse of the Gulf of Maine cod fishery / A.J. Pershing, M.A. Alexander, C.M. Hernandez, L.A. Kerr, A. Le Bris, K.E. Mills, J.A. Nye, N.R. Record, H.A. Scannell, J.D. Scott, G.D. Sherwood // *Science*. – 2015. – V. 350. – P. 809–812.
139. Piry S. BOTTLENECK: a program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies / S. Piry, G. Luikart, J.M. Cornuet // *Journal of Heredity*. – 1999. – V. 90. – P.502-503.
140. Pogson G.H. Nucleotide polymorphism and natural selection at the pantophysin (Pan I) locus in the Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.) / G.H. Pogson // *Genetics*. – 2001. – V. 157. – P. 317–330.
141. Poon A. Compensating for our load of mutations: freezing the meltdown of small populations / A. Poon, S.P. Otto // *Evolution*. – 2000. – V. 54. – № 5. – P.1467-1479.
142. Porter R.W. Frobisher Bay Revisited / R.W. Porter // *J. Am. Geogr. Soc. New York*. –1898. – V. 30. – P. 97–110.
143. Pritchard J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // *Genetics*. – 2000. – V. 155. – № 2. – P.945-959.
144. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing / R Development Core Team. – R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. –2008. – ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org> (дата обращения 1.09.2016)
145. Reznick D.N. Life-history evolution in guppies (*Poecilia reticulata*): 1. Phenotypic and genetic changes in an introduction experiment / D.N. Reznick, H. Bryga // *Evolution*. –1987. – P.1370-1385.
146. Rohlf F.J. An empirical comparison of three ordination techniques in numerical taxonomy / F.J. Rohlf // *Syst Zool*. – 1972. – V. 21. – P.271–280.
147. Rollefson G. The otoliths of the cod—preliminary report / G. Rollefson // *Fiskeridir Skr Ser Havunders*. – 1933. – V.4. – P. 1–18.

148. Rozas J. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods / J. Rozas, J.C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, R. Rozas//Bioinformatics. 2003. –V. 19. – №18. – P.2496-2497.
149. Sacks H. Randomized versus historical controls for clinical trials / H. Sacks, T.C. Chalmers, H. Smith// The American journal of medicine. – 1982. – V. 72. – № 2. – P.233-240.
150. Salvanes A. Sub-populations of coastal cod with different behaviour and life-history strategies / A. Salvanes, J. Skjæraasen, T. Nilsen // Marine Ecology Progress Series. – 2004. – V. 267. – P. 241–251.
151. Samuk K. Inversions and the origin of behavioral differences in cod / K. Samuk// Mol. Ecol. – 2016. – V.25. – № 10. – P.2111-2113.
152. Sayers E.W. Database resources of the National Center for Biotechnology Information / EW Sayers, T Barrett, DA Benson, SH Bryant, K Canese, V Chetvernin, DM Church, M DiCuccio, R Edgar, S Federhen, M Feolo, LY Geer, W Helmberg, Y Kapustin, D Landsman, DJ Lipman, TL Madden, DR Maglott, V Miller, I Mizrachi, J Ostell, KD Pruitt, GD Schuler, E Sequeira, ST Sherry, M Shumway, K Sirotkin, A Souvorov, G Starchenko, TA Tatusova, L Wagner, E Yaschenko, J.Ye // Nucleic Acids Res. – 2009 –V. 37– D5-15.
153. Schlotterer C. Sequencing pools of individuals – mining genome-wide polymorphism data without big funding / C. Schlötterer, R. Tobler, R. Kofler, V. Nolte// Nature Reviews Genetics. – 2014. – V. 15. – №11 – P.749-763.
154. Schmidt D. The effect of population history on the distribution of the Tajima's D statistic / D. Schmidt, J. Pool // – 2002. – Preprint, URL: <http://people.mbi.ohio-state.edu/dschmidt/Publications.html> (дата обращения 1.09.2016)
155. Selkoe K.A. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers / K.A. Selkoe, R.J. Toonen // Ecol Lett. – 2006. – V. 9. – P.615–629.

156. Silander O.K. Understanding the evolutionary fate of finite populations: the dynamics of mutational effects / O.K. Silander, O. Tenailon, L. Chao // PLoS Biol. – 2007. – V. 5. – № 4. – P.e94.
157. Skirnisdottir S. Characterization of 18 new microsatellite loci in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) / S. Skirnisdottir, C. Pampoulie, S. Hauksdottir, I. Schulte, K. Olafsson, G.O. Hreggvidsson, S. Hjorleifsdottir // Molecular Ecology Resources. – 2008. –V.8. – P. 1503-1505.
158. Sodeland M. “Islands of Divergence” in the Atlantic Cod Genome Represent Polymorphic Chromosomal Rearrangements / M. Sodeland, P.E. Jorde, S. Lien, S. Jentoft, P.R. Berg, H. Grove, M.P. Kent, M. Arnyasi, E.M.Olsen, H. Knutsen // Genome Biol. Evol. – 2016. – V. 8. – № 4. – P.1012-1022
159. Sodeland M. “Islands of Divergence” in the Atlantic Cod Genome Represent Polymorphic Chromosomal Rearrangements / M.Sodeland, , P.E. Jorde, S. Lien, Jentoft, S., P.R. Berg, H. Grove, M.P. Kent, M. Arnyasi, E.M. Olsen, H. Knutsen, // Genome Biol Evol. – 2016. – V. 8. – №4. – P.1012-1022.
160. Soule M.E. Viable populations for conservation / M.E. Soule – Cambridge university press. – 1987.
161. Star B. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system / B. Star, A.J. Nederbragt, S. Jentoft, U. Grimholt, M. Malmstrom, T.F. Gregers, T.B. Rounge, J. Paulsen, M.H. Solbakken, A. Sharma, O.F. Wetten // Nature. – 2011. – V. 477. – № 7363. – P. 207-210.
162. Stenvik J. Development of 25 gene-associated microsatellite markers of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) / J. Stenvik, M.S. Wesmajervi, K.T. Fjalestad, B. Damsgaard, M. Delghandi // Molecular Ecology Notes. –2006. – V. 6. – P.1105-1107.
163. Storey J. Package ‘qvalue’ / J. Storey, A. Bass, A. Dabney, D. Robinson. // – 2015. – URL: <http://github.com/jdstorey/qvalue> (дата обращения 1.09.16)
164. Strelkov P. Marine Lake Mogilnoe (Kildin Island, the Barents Sea): one hundred years of solitude / P. Strelkov, N.Shunatova, M. Fokin, N. Usov, M.

- Fedyuk, S. Malavenda, O. Lubina, A. Poloskin, S. Korsun, // *Polar biology*. – 2014. – V. 37. – № 3. – P.297-310.
165. Stroganov A. N. Genus *Gadus* (*Gadidae*): Composition, distribution, and evolution of forms/ A. N. Stroganov // *Journal of Ichthyology*. – 2015. – V. 55. – № 3. – P. 319–336.
166. Swain D.P. Pelagic fishes and the cod recruitment dilemma in the Northwest Atlantic / D.P. Swain, A.F. Sinclair // *Canadian J of Fish and Aqua Sci*. – 2000. – V. 57. – № 7. – P.1321-1325.
167. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism/ F. Tajima // *Genetics*. – 1989. – V. 123. - №3. – P.585–95.
168. Tamura K. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar// *Molecular biology and evolution*. – 2013. – V. 30. – №12. – P.2725-2729.
169. Templeman W. Vertebral numbers in Atlantic cod, *Gadus morhua*, of the Newfoundland and adjacent areas, 1947–71, and their use for delineating cod stocks / W. Templeman // *J Northwest Atl Fish Sci*. – 1981 – V. 2 – P. 21–45.
170. Templeton A.R. The theory of speciation via the founder principle / A.R. Templeton // *Genetics*. – 1980. – V. 94. – № 4. – P.1011-1038.
171. Therkildsen N.O. 2010. Large effective population size and temporal genetic stability in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the southern Gulf of St. Lawrence / N.O. Therkildsen, E.E. Nielsen, D.P. Swain, J.S. Pedersen// *Canadian J of Fish and Aquat Sci*. – 2010. – V. 67. – P. 1585–1595.
172. Thorsteinsson V. Consistency in the behaviour types of the Atlantic cod: repeatability, timing of migration and geo-location / V. Thorsteinsson, O.K. Palsson, G.G., Tomasson, I.G. Jonsdottir, C. Pampoulie // *Marine Ecology Progress Series*. – 2012. –V. 462. – P.251-260.
173. Torresen O.K. An improved genome assembly uncovers a prolific tandem repeat structure in Atlantic cod / O.K. Torresen, B. Star, S. Jentoft, W.B. Reinart, H. Grove, J.R. Miller, B.P. Walenz, J. Knight, J.M. Ekholm, P. Peluso, , R.B. Edvardsen // – 2016. – bioRxiv. – P.060921.

174. Walters C. Cultivation/depensation effects on juvenile survival and recruitment: implications for the theory of fishing / C. Walters, J.F. Kitchell // Canadian J of Fish and Aqua Sci. – 2001. – V. 58. – № 1. – P.39-50.
175. Wang H. BLAST++: BLASTing queries in batches / H. Wang, B.C. Ooi, K.L. Tan, T.H. Ong, L. Zhou// Bioinformatics. – 2003. - V.19. - №17. - P.2323-2324.
176. Waples R.S. Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution / R.S. Waples, C. Do // Evol Appl. – 2010. – V. 3. – P.244–262
177. Waples R.S. Pacific Salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of “species” under the Endangered Species Act / R.S. Waples // MarFish Rev. – 1991. – V. 53. – P.11-22.
178. Ward R.D. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes / R.D. Ward, M. Woodwark, D.O.F. Skibinski // Journal of fish biology. – 1994. – V. 44. – № 2. – P.213-232.
179. Weir B.S. Estimating F-statistics for the analysis of population structure / B.S. Weir, C.C. Cockerham // Evolution. – 1984. – V. 38. – P. 1358–1370.
180. Wesmajervi M.S. Eight new microsatellite markers in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) derived from an enriched genomic library / M.S. Wesmajervi, T. Tafese, J. Stenvik, K.T. Fjalestad, B. Damsgard, M. Delghandi // Molecular Ecology Notes. – 2007. – V.7. –P. 138-140.
181. Westgaard, J.I. Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in inner and outer coastal zones of northern Norway display divergent genetic signature at non-neutral loci / J.I. Westgaard, S.E. Fevolden// Fisheries research. – 2007. – V. 85. –№ 3. – P. 306-315.
182. Willi Y. Limits to the adaptive potential of small populations / Y. Willi, J. Van Buskirk, A.A. Hoffmann // Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. – 2006. – P.433-458.

183. Wilson A.C. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics/ A.C. Wilson, R.L. Cann, S.M. Carr, M. George, U.B. Gyllensten, K.M. Helm-Bychowski, R.G. Higuchi, S.R. Palumbi, E.M. Prager, R.D. Sage, M. Stoneking.// Biol. Jour. Linn. Soc. – 1985. – V. 26. – P. 375-400.
184. Wright S. Size of population and breeding structure in relation to evolution / S. Wright // Science. –1938. – V.87. – № 2263. – P. 430–431.
185. Wright, S. The relation of livestock breeding to theories of evolution / S. Wright //Journal of Animal Science. – 1978. – V. 46. – № 5. – P.1192-1200.
186. Zeyl C. Mutational meltdown in laboratory yeast populations / C. Zeyl, M. Mizesko, J.A.G.M. De Visser // Evolution. – 2001. – V. 55. – № 5. – P.909-917.
187. Zhivotovsky L.A. Human population expansion and microsatellite variation / L.A. Zhivotovsky, L. Bennett, A.M. Bowcock, M.W. Feldman // Mol. Biol Evol. – 2000. – V. 17. – P. 757–767.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1 – Оценка аллельного разнообразия в выборках. Обозначения: N – количество исследованных особей по микросателлитным маркерам, Na – число различных аллелей, Ne – эффективное количество аллелей, I – индекс Шеннона, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, uHe – несмещенная оценка ожидаемой гетерозиготности, Fis – коэффициент инбридинга, с.о. – стандартное отклонение.

Выборка		N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
<b>MOG00</b>	<b>Среднее</b>	12,667	1,667	1,414	0,360	0,317	0,242	0,254	-0,279
	<b>С.о.</b>	0,652	0,126	0,099	0,075	0,073	0,053	0,055	0,051
<b>MOG11</b>	<b>Среднее</b>	36,867	1,667	1,399	0,327	0,227	0,222	0,225	-0,024
	<b>С.о.</b>	0,091	0,126	0,111	0,080	0,060	0,058	0,058	0,027
<b>MOG12</b>	<b>Среднее</b>	32,933	1,667	1,381	0,318	0,247	0,214	0,218	-0,119
	<b>С.о.</b>	0,067	0,159	0,108	0,080	0,068	0,057	0,058	0,038
<b>KS11</b>	<b>Среднее</b>	50,600	9,133	4,739	1,441	0,608	0,602	0,610	-0,031
	<b>С.о.</b>	6,711	1,791	1,024	0,222	0,068	0,071	0,071	0,028
<b>KS12</b>	<b>Среднее</b>	24,000	8,533	4,771	1,459	0,622	0,614	0,627	-0,012
	<b>С.о.</b>	0,000	1,427	1,026	0,212	0,074	0,068	0,069	0,037
<b>BS12</b>	<b>Среднее</b>	22,933	7,867	4,681	1,434	0,638	0,613	0,627	-0,029
	<b>С.о.</b>	0,384	1,283	0,978	0,212	0,078	0,073	0,074	0,029
<b>WS12</b>	<b>Среднее</b>	40,733	8,267	4,555	1,452	0,608	0,637	0,645	0,044
	<b>С.о.</b>	2,008	1,343	0,957	0,192	0,062	0,057	0,058	0,039

Таблица 2 – Оценка аллельного разнообразия по 15 микросателлитным локусам. Обозначения как в таблице 1 данного Приложения.

		Gmo3	PGmo32	Gmo-G12	Gmo34	Gmo-G18	Gmo35	Gmo19	Gmo8	PGmo71	PGmo95	PGmo104	Gmo-C20	GmoUCC-11	Gmo-C172	Gmo-C193
N	<b>Среднее</b>	35,71	35,86	36,86	36,71	36,29	35,43	35,71	34,71	26,86	25,57	26,57	27,14	26,57	26,57	26,43
	<b>С.о.</b>	7,50	7,37	7,81	7,68	7,81	8,17	7,89	6,97	2,91	3,24	3,01	2,86	3,29	3,12	3,40
Na	<b>Среднее</b>	2,71	3,00	4,86	2,71	2,14	5,71	11,00	11,14	5,29	11,14	3,14	7,86	5,86	3,57	3,00
	<b>С.о.</b>	0,64	0,72	1,37	0,71	0,51	1,32	3,39	3,41	1,19	3,25	0,55	2,09	1,26	0,57	0,69
Ne	<b>Среднее</b>	1,16	1,44	2,89	1,37	1,53	4,30	6,72	6,46	2,70	8,02	1,61	5,14	2,76	1,57	1,50
	<b>С.о.</b>	0,06	0,18	0,74	0,20	0,19	0,86	1,68	1,69	0,39	2,32	0,11	1,21	0,58	0,17	0,21
I	<b>Среднее</b>	0,27	0,47	0,92	0,38	0,41	1,37	1,75	1,72	1,14	1,77	0,61	1,54	1,07	0,64	0,48
	<b>С.о.</b>	0,10	0,17	0,33	0,18	0,15	0,25	0,38	0,38	0,19	0,44	0,08	0,33	0,27	0,14	0,16
Ho	<b>Среднее</b>	0,12	0,26	0,41	0,20	0,28	0,70	0,79	0,78	0,63	0,71	0,38	0,71	0,41	0,31	0,30
	<b>С.о.</b>	0,05	0,10	0,15	0,09	0,10	0,07	0,06	0,08	0,04	0,13	0,07	0,10	0,09	0,07	0,09
He	<b>Среднее</b>	0,12	0,24	0,43	0,19	0,27	0,68	0,73	0,71	0,58	0,67	0,36	0,68	0,49	0,32	0,26
	<b>С.о.</b>	0,05	0,09	0,15	0,09	0,10	0,07	0,08	0,09	0,06	0,12	0,05	0,09	0,12	0,07	0,09
uHe	<b>Среднее</b>	0,13	0,25	0,43	0,20	0,28	0,69	0,74	0,72	0,59	0,69	0,37	0,69	0,51	0,33	0,27
	<b>С.о.</b>	0,05	0,09	0,16	0,09	0,10	0,07	0,08	0,09	0,06	0,12	0,05	0,10	0,12	0,07	0,09
F	<b>Среднее</b>	-0,01	-0,05	0,05	-0,04	-0,03	-0,04	-0,13	-0,12	-0,13	-0,05	-0,04	-0,06	0,08	-0,01	-0,11
	<b>С.о.</b>	0,04	0,07	0,03	0,02	0,06	0,06	0,08	0,05	0,07	0,05	0,07	0,05	0,09	0,06	0,04

Таблица 3 – Оценка достоверности отклонения от равновесия Харди-Вайнберга. Обозначения  $n$  – количество генотипированных особей,  $A$  – количество различных аллелей,  $H_e$  – ожидаемая гетерозиготность,  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга,  $p$ -значение – уровень значимости отклонения от равновесия Харди-Вайнберга, н/о – не определено. \* значимое отклонение от равновесия Харди-Вайнберга.

*Озеро Могильное (Кильдинская треска)*

Локус	$n$	$A$	$H_e$	$H_o$	$F_{IS}$	$p$ -значение
Gmo3	79	1	0	0	н/о	н/о
PGmo32	79	1	0	0	н/о	н/о
Gmo-G12	79	1	0	0	н/о	н/о
Gmo34	79	1	0	0	н/о	н/о
Gmo-G18	79	1	0	0	н/о	н/о
Gmo35	71	2	0.481	0.535	-0.113	0.332
Gmo19	74	2	0.503	0.581	-0.156	0.246
Gmo8	75	2	0.498	0.547	-0.099	0.487
PGmo71	78	2	0.413	0.526	-0.275	0.025
PGmo95	73	2	0.329	0.329	0.000	1.000
PGmo104	76	2	0.425	0.421	0.009	1.000
Gmo-C20	79	2	0.485	0.456	0.061	0.647
GmoUCC-11	75	3	0.127	0.133	-0.053	1.000
Gmo-C172	77	2	0.134	0.143	-0.070	1.000
Gmo-C193	74	2	0.027	0.027	-0.007	1.000
All	76.5	2.1	0.228	0.246	-0.081	н/о

*Кильдинская салма*

Локус	$n$	$A$	$H_e$	$H_o$	$F_{IS}$	$p$ -значение
Gmo3	48	6	0.197	0.188	0.047	0.150
PGmo32	47	5	0.440	0.468	-0.065	0.658
Gmo-G12	48	9	0.830	0.813	0.021	0.208
Gmo34	48	6	0.419	0.417	0.006	0.479
Gmo-G18	48	3	0.487	0.438	0.102	0.706
Gmo35	48	8	0.830	0.917	-0.106	0.267
Gmo19	48	21	0.920	0.854	0.072	0.035
Gmo8	48	25	0.935	0.979	-0.048	0.363
PGmo71	48	9	0.659	0.688	-0.044	0.497
PGmo95	48	22	0.941	0.958	-0.019	0.015
PGmo104	48	6	0.334	0.313	0.066	0.158
Gmo-C20	48	15	0.889	0.917	-0.032	0.832
GmoUCC-11	48	11	0.792	0.625	0.212	0.019
Gmo-C172	47	6	0.372	0.319	0.144	0.069
Gmo-C193	48	3	0.338	0.417	-0.238	0.339
All	47.9	10.3	0.625	0.620	0.008	---

Продолжение таблицы 3

*Баренцево море*

Локус	$n$	$A$	$H_e$	$H_o$	$F_{IS}$	$p$ -значение
Gmo3	20	3	0.272	0.250	0.082	0.366
PGmo32	22	4	0.566	0.636	-0.129	0.437
Gmo-G12	24	7	0.793	0.833	-0.051	0.175
Gmo34	24	2	0.042	0.042	0.000	1.000
Gmo-G18	21	4	0.540	0.667	-0.242	0.463
Gmo35	24	9	0.857	0.833	0.029	0.166
Gmo19	24	14	0.921	0.917	0.005	0.921
Gmo8	23	13	0.899	0.870	0.033	0.640
PGmo71	24	8	0.761	0.708	0.070	0.750
PGmo95	20	19	0.949	1.000	-0.056	0.575
PGmo104	23	3	0.166	0.130	0.219	0.128
Gmo-C20	24	13	0.902	1.000	-0.112	0.582
GmoUCC-11	24	9	0.699	0.625	0.109	0.187
Gmo-C172	23	5	0.580	0.565	0.026	0.584
Gmo-C193	24	5	0.462	0.500	-0.084	0.212
All	22.9	7.9	0.627	0.638	-0.018	---

*Белое море*

Локус	$n$	$A$	$H_e$	$H_o$	$F_{IS}$	$p$ -значение
Gmo3	33	3	0.195	0.212	-0.087	1.000
PGmo32	32	4	0.416	0.281	0.328	0.002
Gmo-G12	33	6	0.539	0.424	0.216	0.060
Gmo34	33	5	0.564	0.545	0.034	0.759
Gmo-G18	33	2	0.429	0.424	0.011	1.000
Gmo35	33	8	0.861	0.727	0.157	0.066
Gmo19	32	16	0.919	0.844	0.083	0.118
Gmo8	33	16	0.890	0.939	-0.057	0.841
PGmo71	32	7	0.753	0.719	0.046	0.432
PGmo95	32	17	0.940	1.000	-0.064	0.043
PGmo104	33	3	0.438	0.485	-0.109	0.780
Gmo-C20	33	11	0.865	0.848	0.019	0.290
GmoUCC-11	33	8	0.707	0.364	0.489	0.0001*
Gmo-C172	33	5	0.500	0.485	0.031	0.056
Gmo-C193	33	6	0.612	0.606	0.010	0.482
All	32.7	7.8	0.642	0.594	0.076	---

Таблица 4 – Расположение микросателлитных маркеров в геноме. Используется терминология базы GO (<http://geneontology.org/>) и сервиса Ensembl Biomart (<http://www.ensembl.org/biomart>)

Название локуса	GenBank Accession no.	Имя гена	Ensembl Gene ID	BLAT simmlary match			Gene region	GO Term Accession	GO Term Name
				Геномные координаты	eval	ID%			
Gmo19	AF159232	CSMD1, CUB and Sushi multiple domains 1	ENSGMOG00000012337	GeneScaffold_299.657193.657411.+	1.1e-178	97.72	intron	GO:0004553	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
Gmo3	AF159233		ENSGMOG00000004539	GeneScaffold_835.42456.42896.+	0.0e+00	99.32	intron	GO:0003676	nucleic acid binding
Gmo34	AF159234	kcnd1, potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 1	ENSGMOG00000008556	GeneScaffold_101.37121.37365.+	6.5e-212	100.00	5'UTR	GO:0006811, GO:0055085	ion transport, transmembrane transport
Gmo35	AF159235			contig151271.371.653.+	2.3e-233	96.89	10 teleost fish constrained element		
Gmo8	AF159238	zgc:154045	ENSGMOG00000010129	GeneScaffold_3972.42101.42296.+	1.7e-163	100.00	3'UTR	GO:0007264	small GTPase mediated signal transduction
Gmo-C172	EU086749	ind4, inhibitor of DNA binding 4	ENSGMOG00000013504	GeneScaffold_1523.272737.272866.+	9.1e-99	97.69	5'UTR	GO:0046983	protein dimerization activity
Gmo-C193	EU086755	predicted capn3a, calpain 3a	ENSGMOG00000013176	GeneScaffold_2356.185910.186059.+	1.1e-125	100.00	3'UTR	GO:0004198	calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity

Продолжение таблицы 4

Gmo-C20	CO542424		ENSGMOG00000007390	GeneScaffold_1985.51307.51483.+	2.9e-150	100.00	3'UTR	GO:0007264	small GTPase mediated signal transduction
Gmo-G12	DQ648549	gpr158a, G protein-coupled receptor 158a	ENSGMOG00000015711	GeneScaffold_1122.177965.178083.+	7.1e-91	98.33	intron	GO:0007186	G-protein coupled receptor signaling pathway
Gmo-G18	DQ648553		projected protein coding ENSGMOG00000013887	GeneScaffold_2796.89396.89453.+	5.9e-41	98.28	predicted intron		
GmoUCC-11	JX887874	popdc3	ENSGMOG00000005372	contig150988.751.1079.+	4.2e-265	98.79	intron and part of exon	GO:0016020	membrane
PGmo104	EU735051	med13a, mediator complex subunit 13a	ENSGMOG00000012253	GeneScaffold_4340.1058162.1058323.+	5.7e-130	96.99	intron	GO:0006357	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
PGmo32	DQ191392	nd	Nd	contig337028.1706.1811.+	7.6e-85	99.06	Nd		
PGmo71	EU735043	klf12a, Kruppel-like factor 12a	ENSGMOG00000019561	GeneScaffold_427.126906.127071.+	2.9e-133	97.06	intron	GO:0046872	metal ion binding
PGmo95	EU735048	nr4a1, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	ENSGMOG00000007300	GeneScaffold_1600.92275.92438.+	2.2e-135	98.20	intron and part of exon	GO:0003700, GO:0003707	sequence-specific DNA binding transcription factor activity,

Таблица 5 – дифференциация популяций трески. 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 трех последних выборок (\*) получены из работы Berg et al., 2016. Но наблюдаемая гетерозиготность; Не – ожидаемая гетерозиготность; p-value - p-значение достоверности; q-value -статистической значимости различия с поправкой на долю ложных предсказаний.

		Выборка				
		MOG12	KS12	NEAC*	NCC*	NS*
LG1 (PanI)	Кол-во особей	27	20	48	47	40
	Частота стационарного варианта	0,8	0,55	0,266	0,965	0,988
	Но.	0,3333	0,9	0,5	0,1489	0,0238
	Не.	0,3305	0,5077	0,3991	0,1393	0,0238
	p-value	1	0,0006	0,1372	1	1
	q-value	1	0,0018*	1	1	1
LG2 (PAC3IN3/ss1712298457)	Кол-во особей	33	24	51	48	42
	Частота стационарного варианта	0	0,1458	0,04	0,6364	0,9432
	Но.	0	0,2906	0,0784	0,4583	0,1136
	Не.	0	0,2544	0,0761	0,4833	0,1084
	p-value	1	1	1	0,7675	1
	q-value	1	1	1	1	1
LG7 (AQPI1/ss1712304271)	Кол-во особей	33	24	51	48	42
	Частота стационарного варианта	0	0,0625	0,06	0,7614	0,875
	Но.	0	0,125	0,13725	0,41667	0,25
	Не.	0	0,1196	0,1291	0,41754	0,22126
	p-value	1	1	1	1	1
	q-value	1	1	1	1	1