

УДК 597.541–115(265.53)

Д.С. Курносов¹, С.Ю. Орлова², М.А. Смирнова^{2*}¹ Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4;² Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии,
107140, г. Москва, Верхняя Красносельская, 17

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ТИХООКЕАНСКОЙ СЕЛЬДИ (*CLUPEA PALLASII* VAL.) ОХОТСКОГО МОРЯ И ОЗЕРА АЙНСКОГО ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

Исследовано генетическое разнообразие нерестовых групп сельди из различных нерестовых районов северо-западной части Охотского моря и оз. Айнского о. Сахалин на основании 11 микросателлитных локусов. Все локусы были полиморфны. Степень генетической дифференциации охотоморских сельдей была достоверно значима. Оценки показателей попарной генетической дифференциации F_{ST} варьировали от 0 до 0,4. Полученные данные свидетельствуют о наличии не менее двух локальных стад тихоокеанской сельди в северо-западной части Охотского моря. Сельдь оз. Айнского отчетливо дифференцируется от исследованных охотоморских группировок.

Ключевые слова: сельдь, микросателлитные локусы, генетическая изменчивость, популяционная структура.

Kurnosov D.S., Orlova S.Y., Smirnova M.A. Genetic variations among pacific herring (*Clupea pallasii* Val.) from the Okhotsk Sea and Lake Ainskoye by microsatellite loci // Izv. TINRO. — 2016. — Vol. 187. — P. 116–121.

Genetic variation among spawning groups of pacific herring from different spawning grounds in the northwestern Okhotsk Sea and Lake Ainskoye (Sakhalin Island) is assessed by 11 microsatellite loci. All loci were polymorphic. Genetic differentiation of the herring from the Okhotsk Sea was statistically significant, the pairwise genetic differentiation F_{ST} varied in the range of 0.0–0.4 that suggested existence of at least two local stocks. The herring from Lake Ainskoye was clearly different from the Okhotsk Sea herring.

Key words: herring, microsatellite locus, genetic variation, population structure.

Введение

Тихоокеанская сельдь относится к подвиду восточной, или малопозвонковой, сельди *Clupea pallasii pallasii* (Андряшев, Чернова, 1994). Малопозвонковые сельди обитают в пределах континентального шельфа и смежных глубинных районах, образуя

* Курносов Денис Сергеевич, младший научный сотрудник, e-mail: denkurnos@mail.ru; Орлова Светлана Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: kordicheva@rambler.ru; Смирнова Мария Александровна, младший научный сотрудник, e-mail: masmirnova@gmail.com.

Kurnosov Denis S., junior researcher, e-mail: denkurnos@mail.ru; Orlova Svetlana Y., Ph.D., senior researcher, e-mail: kordicheva@rambler.ru; Smirnova Maria A., junior researcher, e-mail: masmirnova@gmail.com.

локальные стада, различающиеся биологическими, экологическими, морфологическими характеристиками, численностью, а также районами нереста и нагула. Несмотря на экологическую и экономическую важность, а также на значительные усилия по исследованию биологии вида, современные представления о популяционном составе и характере изоляции внутривидовых группировок сельди до сих пор недостаточно полны и противоречивы. Так, изоляция отдельных локальных стад достаточно условна, а на границах ареалов взрослые особи и молодь разных стад могут нагуливаться в одном районе (Мельников, Воробьев, 2001).

Кроме этого, в настоящее время существуют две точки зрения на внутривидовую структуру сельди северной части Охотского моря. Первая предполагает наличие двух популяций: охотской, наиболее многочисленной и промысловозначимой, и гижигинско-камчатской (Науменко, 2001; Смирнов, 2009). Иногда в отдельную популяцию выделяют сельдь Тауйской губы (Смирнов и др., 2005). Вторая точка зрения подразумевает, что выделяемые самостоятельные стада являются зависимыми структурами единой суперпопуляции (Горбачев, 2012).

Ранее для популяционных исследований сельди применяли морфологические признаки (Картавец и др., 2008), но они, как правило, малопригодны в качестве стабильных маркеров, так как в большинстве своем имеют полигенную природу и низкую генетическую компоненту наследуемости (Аллендорф и др., 1991). Следующим этапом в исследованиях популяционной структуры сельди стало применение нового вида маркеров на основании полиморфизма ДНК: исследования на основании анализа аллозимов (Рыбникова, 1999), RAPD-анализ (Лапинский и др., 2008), изучение изменчивости контрольного региона митохондриальной ДНК (Горбачев и др., 2011; Liu et al., 2011), а также широко применяющийся в настоящее время, особенно для многочисленных промысловых видов, анализ микросателлитных локусов ДНК (Beacham et al., 2008; Sugaya et al., 2008; Liu et al., 2011; Семенова и др., 2014; и др.).

Проведенные в последние годы исследования популяционной структуры *Clupea pallasii* Охотского моря при помощи микросателлитных локусов (Семенова и др., 2014) не выявили дифференциации между нерестовыми стадами, несмотря на значительное географическое расстояние между ними. Однако следует помнить, что в подобных исследованиях важным условием является подбор наиболее информативных генетических маркеров, иначе задача по оценке генетического разнообразия может остаться нерешенной.

Популяционная структура сельди оз. Айнского также исследовалась различными методами. По морфометрическим признакам ее относили к сахалино-хоккайдскому стаду (Картавец и др., 2008), но полученные позже данные об изменчивости контрольного региона митохондриальной ДНК свидетельствуют о возможности выделения сельди озера в качестве самостоятельной популяции (Горбачев и др., 2011).

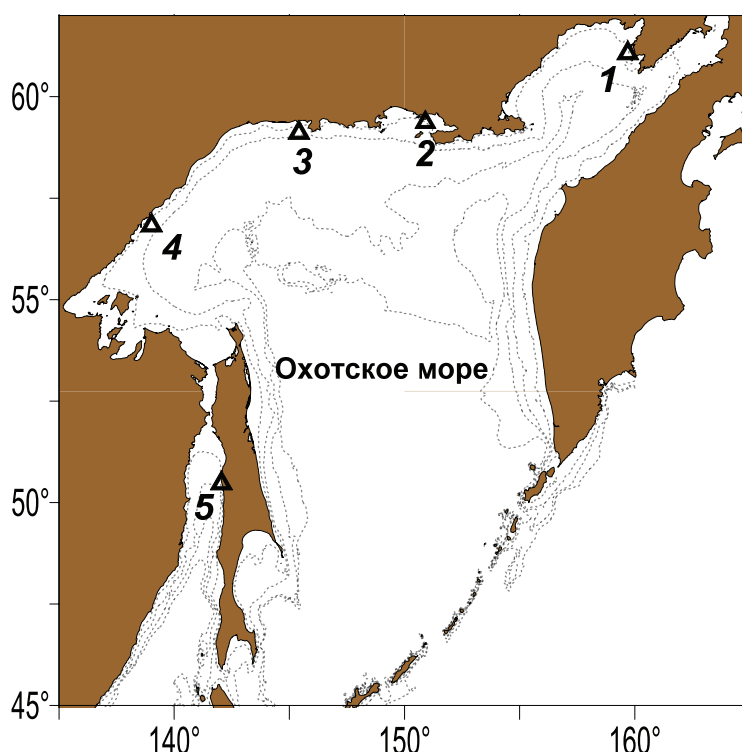
В связи с этим цель данной работы — подбор микросателлитных маркеров и на основании данных об их изменчивости оценка уровня генетической дифференциации сельди Охотского моря и озерной формы сельди Японского моря.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили 4 выборки сельди, собранные в 2008–2010 гг. в период нереста на основных нерестилищах Охотского моря, а также выборка из оз. Айнского на о. Сахалин. Количество проб составило 240 экз. (см. рисунок).

Пробы тканей (фрагмент грудного плавника или сердца) для генетического анализа фиксировали 96 %-ным этанолом в соотношении 1 : 5 (табл. 1).

Тотальную ДНК выделяли из фрагментов плавников и сердец при помощи наборов реактивов «ДНК-СОРБ-С» согласно протоколу фирмы-изготовителя. В процессе работы было апробировано 19 тетрауклеотидных микросателлитных локусов (Cha4, Cha1059, Cpa4, Cpa101, Cpa102, Cpa104, Cpa105, Cpa107, Cpa108, Cpa111, Cpa112, Cpa113, Cpa114, Cha1017, Cha1020, Cha1027, Cha1202, Msild17, Msild32) (Miller et al., 2001; Olsen et al., 2002; Libungan et al., 2012).



Карта сбора материала. Названия выборок указаны в табл. 1
Scheme of sampling. Names of the samples as in Table 1

Таблица 1

Места сбора проб и объем материала

Table 1

Sampling location and volumes

Выборка	Местоположение	Кол-во образцов	Дата
1	Гижигинская губа	48	Май 2008
2	Тауйская губа	48	Июль 2010
3	Пос. Охотск	48	Май 2009
4	Зал. Алдома	48	Июнь 2009
5	Оз. Айнское	48	Июнь 2009

Для дальнейшего анализа апробированные микросателлитные локусы формировались в мультиплексы с внедрением в каждый прямой праймер каждого локуса одной из трех флуоресцентных меток (TAMRA, R6G, FAM). По итогам предварительных исследований было отобрано 11 наиболее подходящих для дальнейшей работы микросателлитных локусов, сформированных в 4 мультиплекса (табл. 2). При этом из работы были исключены 8 микросателлитных маркеров, что обусловлено такими причинами, как отсутствие полиморфизма, а также невозможность четкой интерпретации полученных хроматограмм.

Для проведения реакций амплификации были подобраны следующие условия: денатурация ДНК — 95 °C в течение 5 мин, с последующими 34 циклами, состоящими из 15 с денатурации ДНК матрицы при 92 °C, 30 с отжига праймеров при 60 °C и синтеза новых цепей в течение 1 мин при 72 °C, затем следовала завершающая элонгация 5 мин при 72 °C.

После проведения полимеразной цепной реакции полученный продукт амплификации микросателлитных локусов в объеме 2 мкл очищали от примесей методом этанол-преципитации (Silva et al., 2001) и растворяли в 12 мкл формамида (Hi-Di), денатурировали при температуре 95 °C в течение 3 мин. Электрофоретическое разделение

Таблица 2

Характеристики микросателлитных локусов

Table 2

Parameters of microsatellite loci

Мультиплекс	Локус	Число аллелей	Размер фрагмента, п.н.	Метка	Температура отжига, °С	Источник данных о последовательности праймера
Multiplex 1	Cpa113	20	130–210	Tamra	60	Olsen et al., 2002
	Cpa112	14	230–310	R6G	60	«
	Cpa108	13	210–290	Fam	60	«
	Cha1017	6	140–180	Fam	60	McPherson et al., 2001
Multiplex 2	Msild32	16	160–260	Fam	60	Libungan et al., 2012
	Cpa104	23	160–270	R6G	60	Olsen et al., 2002
Multiplex 3	Cha1059	13	40–100	Fam	60	McPherson et al., 2001
	Cpa111	17	220–310	Fam	60	Olsen et al., 2002
	Cpa114	18	180–260	R6G	60	«
Multiplex 4	Cpa105	21	150–270	R6G	60	«
	Cha1202	10	80–130	Fam	60	McPherson et al., 2001

продуктов амплификации проводили с помощью системы капиллярного электрофореза «ABI3100 Genetic analyzer». Полученные исходные хроматограммы обрабатывались с помощью программного обеспечения «GeneMarker software 1.2». Основные генетические показатели выборок были получены с помощью статистических программ Arlequin 2.0, GenAlEx 6.41, Statistica 6.

Результаты и их обсуждение

Все исследованные микросателлитные локусы были достаточно полиморфны для оценки популяционной структуры сельди. Число аллелей варьирует от 6 (Cha1017) до 17 (Cpa105).

В результате исследований по большинству локусов отклонения от равновесия Харди-Вайнберга не наблюдалось, но обнаружены микросателлитные локусы, которые показывают отклонение от равновесия Харди-Вайнберга в некоторых выборках (табл. 3). Данный эффект можно объяснить неравномерностью выборок, смесью популяций («эффект Валунда»), инбридингом или наличием нуль-аллелей.

Значения F_{ST} , рассчитанные по частотам аллелей микросателлитных локусов для оценки генетической дифференциации, позволили обнаружить статистически значимые различия между выборками из оз. Айнского и Гижигинской губы и остальными (табл. 4). После применения коррекции для множественных тестов различия остались статистически значимыми ($p < 0,05$). Между тайской, охотской и алдомской выборками различий не обнаружено.

Заключение

По результатам проведенной работы отобрано и апробировано 11 микросателлитных локусов, использование которых представляется перспективным в дальнейшем анализе внутривидовой подразделенности сельди.

Полученные статистические оценки свидетельствуют о наличии генетической дифференциации между популяцией сельди, обитающей в водах северо-западной части Охотского моря (частью которой являются проанализированные тайская, охотская и алдомская выборки), и популяцией, обитающей в северо-восточной части Охотского моря, в зал. Шелихова (частью которой является проанализированная гижигинская выборка). Таким образом, можно сделать вывод о наличии в северной части Охотского моря как минимум двух самостоятельных популяций сельди.

Достоверные отличия выборки сельди оз. Айнского от всех исследованных выборок из северной части Охотского моря интересны с точки зрения понимания микроэволюционных процессов. Известно, что озерные сельди генетически наиболее обособлены от всех других групп тихоокеанских сельдей (Рыбникова, 1999). Возможно, озерные жилые формы сельди находились в репродуктивной изоляции от морских популяций

Генетическая характеристика выборок сельди по микросателлитным локусам

Genetic characteristic of herring samples by microsatellite loci

Table 3

Локус	Характеристика выборки	Выборка				
		Gizh	Oh	Tay	Ain	Ald
Cpa113	n	48	48	48	48	48
	A	15	14	14	16	16
	p	0,2463	0,0815	0,1281	0,2218	0,0764
Cpa112	n	48	48	48	48	48
	A	11	12	13	12	9
	p	0,0018	0,1973	0,0749	0,2114	0,0126
Cpa108	n	48	48	48	48	48
	A	9	8	9	7	10
	p	0,8504	0,1096	0,3430	1,0	0,0290
Cha1017	n	48	48	48	48	48
	A	6	6	6	6	6
	p	0,0006	0,0234	0,0265	0,1185	0,3700
Msild32	n	48	48	48	48	48
	A	12	13	13	15	13
	p	0,0129	0,7230	0,5567	0,4842	0
Cpa104	n	48	48	48	48	48
	A	16	12	14	11	15
	p	0	0,0314	0,0054	0,0273	0,6600
Cha1059	n	48	48	48	48	48
	A	9	10	13	10	10
	p	0,2233	0,0433	0,0104	0,0059	0,0004
Cpa111	n	48	48	48	48	48
	A	14	9	14	12	11
	p	0,0127	0,3690	0,0296	0,5141	0,8020
Cpa114	n	48	48	48	48	48
	A	15	14	16	15	15
	p	0,0236	0,6173	0,1096	0,0375	0,3045
Cpa105	n	48	48	48	48	48
	A	17	12	13	15	15
	p	0,5442	0,9713	0,4771	0,1480	0,1933
Cha1202	n	48	48	48	48	48
	A	8	9	8	10	7
	p	0,0161	0,2017	0,0010	0,7243	0,0098

Примечание. n — количество исследованных экземпляров; A — число аллелей; p — вероятность соответствия генотипических распределений равновесию Харди-Вайнберга (выделены результаты $p < 0,05$).

Оценки показателей попарной генетической дифференциации F_{ST}

Выделены достоверные различия $p < 0,05$

Table 4

Pairwise genetic differentiation F_{ST} . Statistically significant differences ($p < 0.05$) are displayed

Выборка	Гижигинская	Охотская	Тауйская	Алдома	Айнская
Гижигинская	~				
Охотская	0,01802	~			
Тауйская	0,04505	0,0991	~		
Алдома	0,01802	0,4234	0,0991	~	
Айнская	0	0	0	0	~

и сформировались во времена расселения сельди по акватории Тихого океана. Для уточнения популяционного статуса сельди из оз. Айнского в дальнейшем планируется провести сравнительный анализ с образцами из Японского и Берингова морей.

Следует подчеркнуть, что продолжение исследований внутривидовой принадлежности сельди предполагает как увеличение материала в анализе, так и расширение генетических маркеров.

Список литературы

- Аллендорф Ф.У., Риман Н., Аттер Ф.М. Генетика и управление рыбным хозяйством // Популяционная генетика и управление рыбным хозяйством. — М. : Агропромиздат, 1991. — С. 15–36.
- Андряшев А.П., Чернова Н.В. Аннотированный список рыбообразных и рыб морей Арктики и сопредельных вод // Вопр. ихтиол. — 1994. — Т. 34, № 4. — С. 435–456.
- Горбачев В.В. Миграции как причина генетической однородности тихоокеанской сельди (*Clupea pallasii*) Охотского моря // Вавиловский журн. генетики и селекции. — 2012. — Т. 16, № 4/2. — С. 914–921.
- Горбачев В.В., Соловчук Л.Л., Черноиванова Л.А. Внутривидовая структура тихоокеанской сельди *Clupea pallasii* Valenciennes, 1847 (Clupeidae: Clupeiformes) Японского и южной части Охотского морей по данным об изменчивости контрольного региона митохондриальной ДНК // Биол. моря. — 2011. — Т. 37, № 6. — С. 472–476.
- Картавцев Ю.Ф., Пушникова Г.М., Рыбникова И.Г. Многомерный морфометрический анализ комплекса внешних признаков сельди *Clupea pallasii* (Clupeiformes: Clupeidae) из вод Сахалина: исследование дифференциации популяций // Биол. моря. — 2008. — Т. 34, № 5. — С. 336–345.
- Лепинский А.Г., Смирнов А.А., Горбачев В.В., Соловчук Л.Л. Генетическая дифференциация североохотоморской группировки тихоокеанской сельди *Clupea pallasii* Valenciennes, 1847 (Clupeidae, Clupeiformes) по данным RAPD // Вопр. рыб-ва. — 2008. — Т. 9, № 1(33). — С. 128–137.
- Мельников И.В., Воробьев П.В. Распределение и миграции неполовозрелой сельди в северной части Охотского моря // Вопр. рыб-ва. — 2001. — Т. 2, № 3(7). — С. 403–421.
- Науменко Н.И. Биология и промысел морских сельдей Дальнего Востока : моногр. — Петропавловск-Камчатский : Камчат. печат. двор, 2001. — 330 с.
- Рыбникова И.Г. Популяционная структура тихоокеанской сельди *Clupea pallasii* (Valenciennes) Японского и Охотского морей : автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 1999. — 23 с.
- Семенова А.В., Строганов А.Н., Смирнов А.А. и др. Генетическая изменчивость сельди *Clupea pallasii* Охотского моря по микросателлитным маркерам // Генетика. — 2014. — Т. 50, № 2. — С. 197–202.
- Смирнов А.А. Гижигинско-камчатская сельдь : моногр. — Магадан : МагаданНИРО, 2009. — 149 с.
- Смирнов А.А., Марченко С.Л., Кашенко Е.В. Оценка популяционного статуса сельди Тауйской губы Охотского моря по результатам морфометрического анализа 2001–2002 гг. // Тез. докл. 6-й науч. конф. «Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей». — Петропавловск-Камчатский : Камчатпресс, 2005. — С. 253–255.
- Beacham T.D., Schweigert J.F., McConnachie C. et al. Use of Microsatellites to Determine Population Structure and Migration of Pacific Herring in British Columbia and Adjacent Regions // Trans. Amer. Fish. Soc. — 2008. — Vol. 137, № 6. — P. 1795–1811.
- Libungan L.A., Ólafsdóttir G., Skírnisdóttir S. et al. Fourteen new microsatellite markers for Atlantic herring *Clupea harengus* // Journ. of Fish. Biology. — 2012. — Vol. 81, Iss. 4. — P. 1422–1426.
- Liu M., Gao T., Sakurai Y. et al. Mitochondrial DNA control region diversity and population structure of Pacific herring (*Clupea pallasii*) in the Yellow Sea and the Sea of Japan // Chin. J. Ocean. Limnol. — 2011. — Vol. 29, Iss. 2. — P. 317–325.
- McPherson A.A., O'Reilly P.T., McParland T.L. et al. Isolation of nine novel tetranucleotide microsatellites in Atlantic herring (*Clupea harengus*) // Mol. Ecol. Notes. — 2001. — Vol. 1, Iss. 1–2. — P. 31–32.
- Miller K.M., Laberee K., Schulze A.D., Kaukinen K.H. Development of microsatellite loci in Pacific herring (*Clupea pallasii*) // Mol. Ecol. Notes. — 2001. — Vol. 1, Iss. 3. — P. 131–132.
- Olsen J.B., Lewis C.J., Kretschmer E.J. et al. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from Pacific herring // Mol. Ecol. Notes. — 2002. — Vol. 2, Iss. 2. — P. 101–103.
- Silva W.A., Costa Jr. M.C.R., Valente V. et al. PCR template preparation for capillary DNA sequencing // BioTechniques. — 2001. — Vol. 30, № 3. — P. 537–542.
- Sugaya T., Sato M., Yokoyama E. et al. Population genetic structure and variability of Pacific herring *Clupea pallasii* in the stocking area along the Pacific coast of northern Japan // Fish. Sci. — 2008. — Vol. 74, Iss. 3. — P. 579–588.

Поступила в редакцию 1.09.16 г.