

УДК 575.17

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СЕВЕРООХОТОМОРСКОЙ
ГРУППИРОВКИ ТИХООКЕАНСКОЙ СЕЛЬДИ *CLUPEA PALLASII*
VALENCIENNES, 1847 (CLUPEIDAE; CLUPEIFORMES),
ПО ДАННЫМ RAPD**

© 2008 г. А.Г. Лапинский¹, А.А. Смирнов², В.В. Горбачев¹,
Л.Л. Соловечук¹

¹ – Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан 685000

² – Магаданский научно-исследовательский институт рыбного
хозяйства и океанографии, Магадан 685000

Поступила в редакцию 26.07.2007 г.

С использованием метода RAPD изучены генетические характеристики трех выборок североохотоморских группировок тихоокеанской сельди *Clupea pallasii* – охотской, гижигинско-камчатской и стада Тауйской губы. Обнаружены высоко достоверная дифференциация перечисленных группировок, высокое генетическое разнообразие в каждой из них и наличие локусов, предположительно не являющихся нейтральными. Группировка Тауйской губы оказалась генетически ближе к гижигинско-камчатской и обе они превышают охотскую по показателям генетического разнообразия.

Тихоокеанскую сельдь в настоящее время относят к номинативному подвиду восточной или малопозвонковой сельди – *Clupea pallasii pallasii* Val. (Андряшев, Чернова, 1994). Малопозвонковые сельди не осуществляют крупномасштабных перемещений и в течение жизни обитают в пределах верхнего слоя континентального шельфа. С этим связано и существование достаточно изолированных группировок – локальных стад. Ряд исследователей попытались выделить эти группировки на основе изучения взрослых особей сначала нерестовых, а затем и нагульных скоплений. Было показано, что структура вида сельди заключается в существовании достаточно обособленных локальных стад, обитающих и нерестующих в ограниченных районах (Наймарк, 1992; Наймарк, Фролов, 1993).

Каждое локальное стадо сельди имеет свой нерестовый и нагульный ареалы и различается по биологическим признакам, из которых наиболее существенны длина, возрастной состав, скорость роста и созревания, сроки икротетания (Дмитриев, 1946), а также морфологически, что обусловлено неоднородностью условий обитания в разных районах. Тем не менее, морфологические особенности при выделении различных локальных стад часто оказываются ненадежными критериями.

Изоляция отдельных локальных стад достаточно условна. На границах ареалов взрослые особи и молодь разных стад могут нагуливаться в одном районе (Мельников, Воробьев, 2001). При этом, по мнению некоторых авторов, возможно даже использование одних нерестилищ разными локальными группировками.

Относительная изоляция разных стад в этом случае достигается за счет разных сроков икротетания (Дружинин, 1959).

Охотская популяция тихоокеанской сельди в настоящее время является самой крупной в Охотском море. В сезон летнего откорма охотская сельдь занимает всю западную половину Охотского моря, включая северо-восточное побережье Сахалина (Радченко, Глебов, 1995).

Гижигинско-камчатская сельдь обитает в восточной части Охотского моря, включая Притауйский район, зал. Шелихова и западнокамчатский шельф. На северо-западной окраине ареала она смешивается с охотской сельдью (нерестовый ареал и у той, и у другой популяций соприкасается в районе Тауйской губы).

Некоторые исследователи (Рыбникова, 1985; Смирнов и др., 2005), основываясь на генетических и морфометрических данных, выделяют притауйскую группировку сельди в самостоятельное локальное образование. Однако такое мнение не пользуется поддержкой среди ряда исследователей.

Одним из наиболее информативных методов популяционно-генетического анализа является определение полиморфизма длины фрагментов ДНК, амплифицируемых в пермиссивных условиях с декамерными праймерами произвольной последовательности (RAPD). Продуцируемые в полимеразной цепной реакции фрагменты – ампликоны являются менделирующими признаками, рассматриваемыми, как доминантные. RAPD неоднократно и успешно использовался для генетической дифференциации на уровнях от индивидуального до видового (Банникова, 2004).

Целью настоящей работы стало изучение методом RAPD показателей генетического разнообразия и уровня дифференциации популяций североохотоморской сельди – охотской, гижигинско-камчатской и, предположительно, тауйской.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Были изучены 71 образец камчатско-гижигинской, 72 – охотоморской и 75 – тауйской группировок сельди, выловленных весной 2005 г. Районы вылова отмечены на рисунке 1. Мышечная ткань до выделения ДНК хранилась при -18 °С. Выделение ДНК проводилось традиционной фенол-хлороформной экстракцией (Методы..., 1984), определение содержания ДНК в экстрактах проводилось с реактивом Бартона (Клонирование..., 1988). Для RAPD-анализа были использованы три декамерных праймера А 6, А 9 и А 10 с последовательностями 5'-GGTCCCTGAC-3', 5'-GGGTAACGCC-3' и 5'-GTGATCGCAG-3' производства фирмы Syntol (Россия). ПЦР проводилась с использованием сухих наборов GenePak™ PCR Core, производства фирмы Интроген (Россия) и содержащих в инкубационной смеси объемом 25 мкл 40+60 нг матрицы, 1 ед. ингибированной

для горячего старта Taq-полимеразы, 200 мкМ dNTP, 2,5 мМ MgCl₂ и 0,2 мкМ праймера. Амплификация проводилась на приборе Gene Amp PCR 2720 (фирма Applied Biosystems, США), после денатурации 94 °С – 5 мин. 30 циклов: 94 °С – 30 сек. 37 °С – 30 сек. 72 °С – 1,5 мин. с последней выдержкой при 72 °С 7 мин. Продукты амплификации разделялись электрофорезом на агарозных гелях и визуализировались в УФ-свете после выдерживания гелей в растворе бромистого этидия. Учитывались стабильно воспроизводимые (в т.ч. в дубликатах) ампликоны в диапазоне 1500 – 150 п.н. (рис. 2, 3, 4). В качестве маркеров молекулярной массы использовались фрагменты HinF I - рестрикта ДНК pBR 322 в смеси со 100 п.н. леддером. Для статистической обработки по каждому праймеру и для всех трех праймеров вместе составлялись бинарные матрицы, в которых наличие или отсутствие в спектре учитываемого фрагмента обозначались как «1» или «0»; фрагменты одинакового размера рассматривались как гомологичные и различия в интенсивности их флуоресценции во внимание не принимались. Статистическая обработка проводилась с использованием программного продукта POPGENE 32.1 (Yeh, Boyle, 1997): рассчитывались наблюдаемое и эффективное число аллелей (Kimura, Crow, 1964), генное разнообразие по Нею, а также субпопуляционная гетерозиготность H_s и гетерозиготность в тотальной популяции H_t (Nei, 1973), соответствие обследованных локусов тесту Эванса-Ваттерсона на нейтральность (Manly, 1985), а также информационный индекс Шеннона для оценки фенотипического разнообразия, поскольку его применение не требует предположения о соблюдении в популяции равновесия Харди-Вайнберга (Артюкова и др., 2004). Индекс разнообразия или энтропии Шеннона рассчитывался как $H_0 = -\sum_i p_i \log_2 p_i$, где p_i – частота i -того RAPD-фрагмента в популяционной выборке и для суммарной выборки как $H_{sp} = -\sum_k p_k \log_2 p_k$, где p_k – частота k -того фрагмента. Также рассчитывали H_{pop} как среднее значение H_0 для всех выборок, долю внутривнутрипопуляционного разнообразия как H_{pop}/H_{sp} и долю межпопуляционного разнообразия как $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$ (Артюкова и др., 2004). С использованием пакета TFGPA (Miller, 1997) проводился тест на дифференциацию популяций (Rousset, Raymond, 1995), а также, на основе метода «складного ножа» (jackknifing), рассчитывались несмещенные оценки и доверительные интервалы F-коэффициентов Райта F_{st} для различных пар популяций как меры подразделенности популяций (Вейр, 1995).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использованные праймеры позволяют надежно тестировать 23 полиморфных локуса (рис. 2, 3, 4), по которым все изученные выборки демонстрируют наличие высокого генного разнообразия (табл. 1, 2), причем почти 95% всей изменчивости обусловлено внутривнутрипопуляционными различиями (табл. 2), что согласуется с результатами изучения аллозимной изменчивости тихоокеанской сельди (Картавец, Рыбникова, 1999; Рыбникова, 1999).



Рис. 1. Участки вылова исследованных образцов сельди.

Fig. 1. Catch locations of the studied herring smplings.

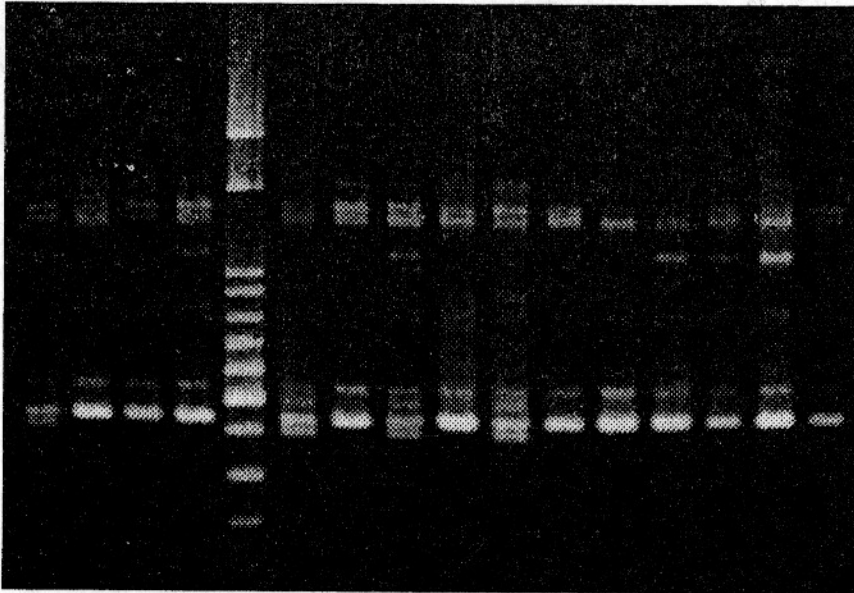


Рис. 2. Ампликоны RAPD, получаемые с праймером А6 (5 трек слева – маркер молекулярной массы).

Fig. 2. RAPD amplicones obtained using primer A6 (the 5-th track from the left is a molecular weight marker).

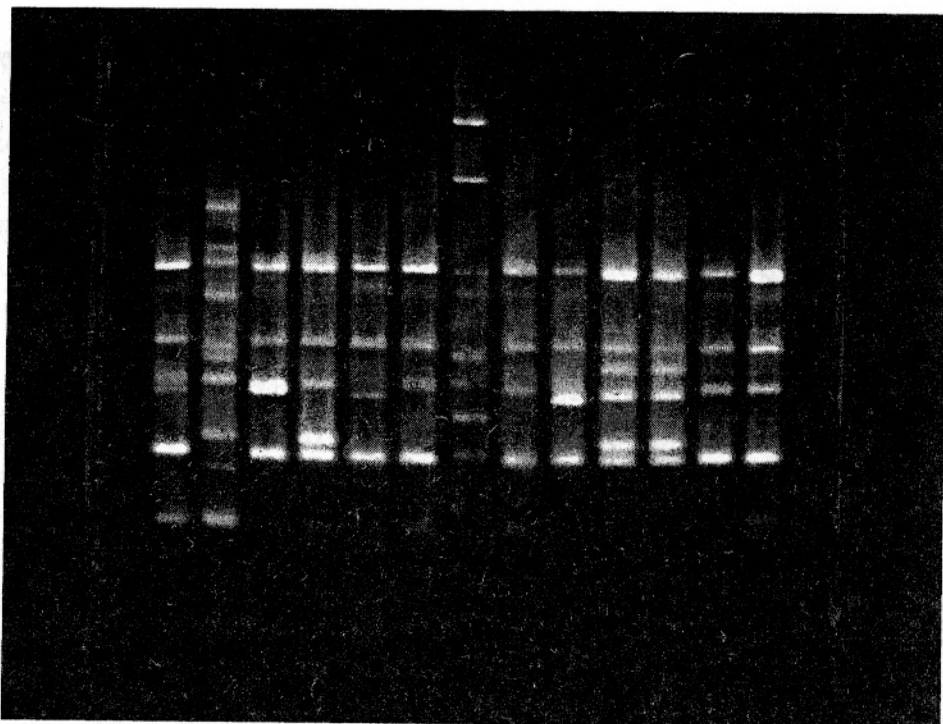


Рис. 3. Ампликоны RAPD, получаемые с праймером А9 (средний трек – маркер молекулярной массы).

Fig. 3. RAPD amplicones obtained using primer A9 (the middle track is a molecular weight marker).

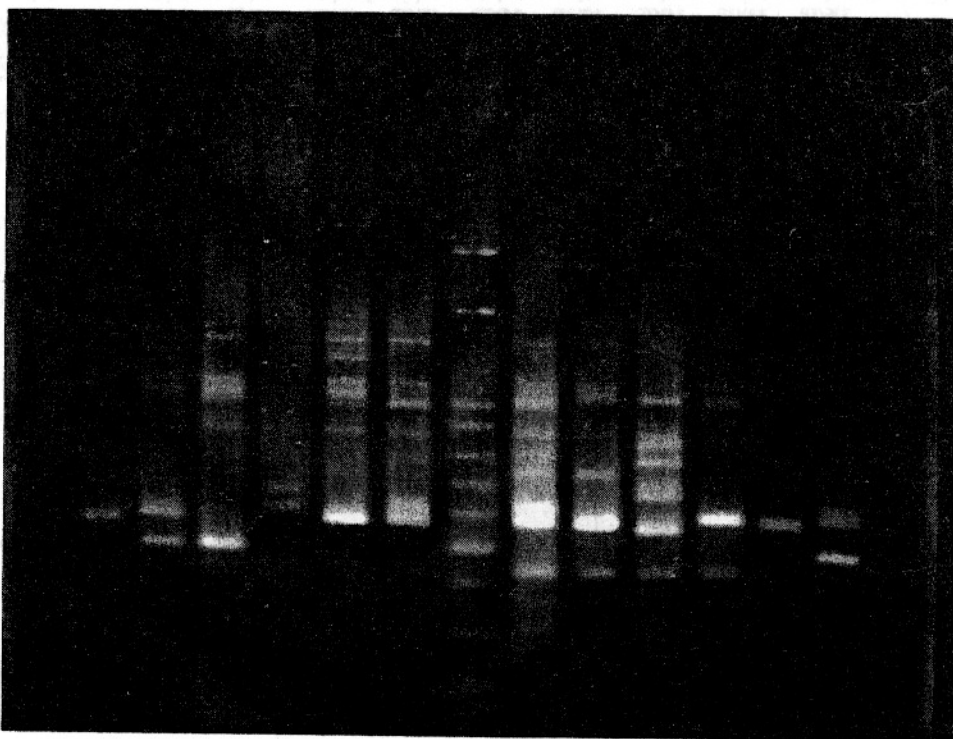


Рис. 4. Ампликоны RAPD, получаемые с праймером А10 (средний трек – маркер молекулярной массы).

Fig. 4. RAPD amplicones obtained using primer A10 (the middle track is a molecular weight marker).

Таблица 1. Показатели генного разнообразия охотской, гижигинско-камчатской и тауйской группировок тихоокеанской сельди *Clupea pallasii*.

Table 1. Indices of genetic diversity of Okhotsk, Gizhiga-Kamchatka, and bay of Tauysk groupings of Pacific herring, *Clupea pallasii*.

Выборки	Эффективное число аллелей	Генное разнообразие по Нею	Средняя гетерозиготность	Средняя гетерозиготность (несмещенная)
Охотская	1,3324±0,3207	0,2119±0,1649	0,2119	0,2134
Гижигинско-камчатская	1,5160±0,3642	0,3018±0,1698	0,3018	0,3044
Тауйская	1,4991±0,3604	0,2956±0,1645	0,2956	0,2977

Таблица 2. Показатели фенетического разнообразия по Шеннону охотской, гижигинско-камчатской и тауйской группировок тихоокеанской сельди *Clupea pallasii*.

Table 2. Shannon indices of phenetic diversity of Okhotsk, Gizhiga-Kamchatka, and bay of Tauysk groupings of Pacific herring, *Clupea pallasii*.

H_0			H_{sp}	H_{pop}	H_{pop} / H_{sp}	$\frac{(H_{sp} - H_{pop})}{n}$
Охотская	Гижигинско-камчатская	Тауйская				
0,3433	0,4585	0,4533	0,4429	0,4184	0,9446	0,0553

Выполненный по всем локусам тест Фишера на дифференциацию выявил высоко достоверную неоднородность исследованных популяций ($\chi^2 = 252,0478$ при $df = 46$, общая $P < 0,001$). Это также сопоставимо с результатами изучения популяционной структуры тихоокеанской сельди, выполненного по аллозимным локусам (Картавцев, Рыбникова, 1999; Рыбникова, 1999). Наряду с высокой дисперсией по перечисленным выше параметрам, обеспечивающей генетическую приспособленность популяции, этот факт свидетельствует об устойчивости названных параметров и соответствует представлениям Фишера об условиях, способствующих выживанию популяции в экстремальных экологических условиях (Fisher, 1930). То, что, высокие границы разнообразия в популяции снижают способность выявлять дифференциацию в крупных группировках (Nagylaki, 1998), делает результаты теста Фишера тем более убедительными.

Еще более убедительным в этом отношении представляется минимальное генетическое расстояние \bar{D}_m , рассчитанное на основании полученных значений H_s ($0,2425 \pm 0,0195$) и H_t ($0,2749 \pm 0,0267$) как абсолютная мера генетической дифференциации, независимая от генного разнообразия внутри популяции $\bar{D}_m = k/k-1 (H_t - H_s)$ (где k – число популяций) (Nei, 1973). Для изученных выборок оно составило 0,0486, что сопоставимо со значениями, определенными как в человеческой популяции (0,019), так и у *Escherichia coli* (0,028) (Хедрик, 2003). Столь высокое значение \bar{D}_m позволяет североохотоморской группировке тихоокеанской сельди претендовать на положение макрогеографической группы (Рыбникова, 1999), а также согласуется со сделанным этим автором заключением

о наличии выраженной географической компоненты в генетической дифференциации тихоокеанской сельди.

При рассмотрении подразделенности выборок (табл. 3), как и следовало ожидать, охотская и гижигинско-камчатская выборки отстоят друг от друга наиболее далеко. Тауйская же группировка оказалась вдвое ближе к гижигинско-камчатской, нежели к охотской. Подобные же результаты получены при расчете генетических дистанций между изученными выборками по Нею (Nei, 1972) (рис. 5).

Таблица 3. Межпопуляционные значения корреляционных коэффициентов Райта F_{st} охотской (1), гижигинско-камчатской (2) и тауйской (3) группировок тихоокеанской сельди *Clupea pallasii*.

Table 3. Interpopulation Wright F_{st} correlation coefficients of Okhotsk (1), Gizhiga-Kamchatka (2), and bay of Tauysk (3) groupings of Pacific herring, *Clupea pallasii*.

Пара сравнения	1 - 2	1 - 3	2 - 3
F_{st}	0,1396±0,0453	0,0876±0,0300	0,0375±0,0144

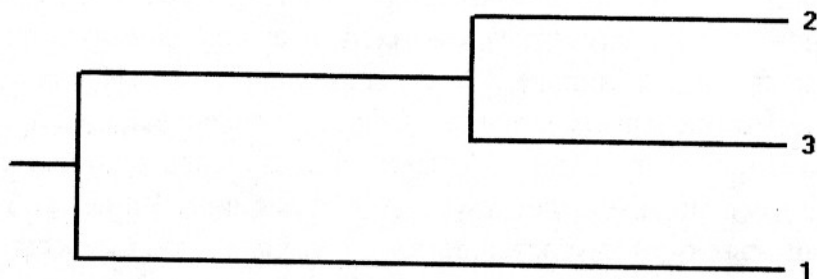
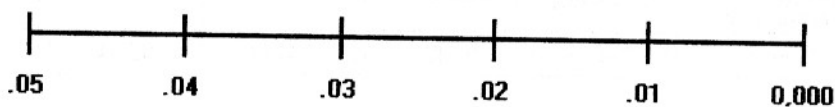


Рис. 5. Дендрограмма генетических дистанций (Nei, 1972) между охотской (1), гижигинско-камчатской (2) и тауйской (3) группировками тихоокеанской сельди *Clupea pallasii*.

Fig. 5. Dendrogram based on Nei's (1972) genetic distances between Okhotsk (1), Gizhiga-Kamchatka (2), and bay of Tauysk groupings of Pacific herring *Clupea pallasii*.

Высокая дисперсия не позволяет говорить о достоверных различиях таких показателей, как наблюдаемое и эффективное число аллелей, генное разнообразие по Нею и средняя гетерозиготность, в т.ч. несмещенная, но и здесь средние значения всех этих показателей для гижигинско-камчатской и тауйской выборок наиболее близки.

Тауйское стадо оказалось также ближе к гижигинско-камчатскому, чем к охотскому, по такому показателю, как значение разнообразия по Шеннону, причем Шенноновский индекс для гижигинско-камчатской и тауйской выборок оказался максимально приближенным к видовому. Однако, наряду со значениями F_{st} ,

считать группировку тауйской сельди частью гижигинско-камчатского стада препятствует и то обстоятельство, что, хотя выявляемое методом RAPD разнообразие обусловлено, в значительной мере, высокой скоростью мутирования и близко к нейтральности (Lee et al., 2002), присутствие в каждой из выборок, как и в суммарной выборке, локусов, не отвечающих условиям теста Эванса-Ваттерсона на нейтральность (в охотской выборке ему не удовлетворяло три локуса, два – в гижигинско-камчатской и по одному – в притауйской и суммарной выборках), могло бы представиться неожиданным, что, впрочем, не исключает стохастического характера этой находки. Однако, если рассматривать ее как результат селекции, она может согласовываться с вышеупомянутыми биологическими отличиями индивидуумов из разных локальных стад, находящихся в различных экологических условиях и может свидетельствовать о разнонаправленности селективных процессов как в различных локальностях, так и в суммарной выборке в целом, что согласуется со сформулированным Рыбниковой (Рыбникова, 1999) представлением о селективно-зависимой дифференциации локальных стад, представляющих собой объединения нескольких, часто географически отдаленных группировок сельди.

Разнонаправленные селективные процессы также могут объяснить более высокое разнообразие в гижигинско-камчатской выборке по сравнению с охотской, несмотря на ее гораздо меньшую эффективную численность и, казалось бы, большую географическую изолированность. Оба последних обстоятельства могут преодолеваются также протяженными миграциями, нерестовыми и нагульными, отмеченными для гижигинско-камчатской популяции (Науменко, 2001), как и отсутствием у сельди выраженного хоминга. Вероятно все это, наряду с селективными процессами, может позволять тихоокеанской сельди поддерживать высокий уровень генетического разнообразия при выраженной дифференцировке, несмотря на характерное для данного вида существование в форме локальных стад. Это утверждение не представляется надуманным, поскольку способность локусов RAPD тестировать различные участки генома, делает их (с некоторыми ограничениями) подходящими маркерами для проверки влияния отбора на популяционно-генетическую структуру (Hadrys et al., 1992). И подобные примеры известны, когда выявляемая методом RAPD генетическая гетерогенность не определяется эффективным размером группировки и даже находится с ним в обратной корреляции (Vucetich et al., 2001).

Можно заключить, что изученные выборки представляют высоко дифференцированные популяции. В какой степени дифференциация этих популяций отражает естественные процессы сегрегации и пластической адаптации и в какой – рыбохозяйственной деятельности, возможно определить лишь путем долгосрочного мониторинга. Но исключительно высокое генетическое разнообразие североохотоморской группировки тихоокеанской сельди позволяет прогнозировать ее высокую устойчивость.

Также имеются основания считать тауйское стадо североохотоморской сельди самостоятельной популяцией, генетически более близкой к гижигинско-камчатской популяции, нежели к охотской.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андряшев А.П., Чернова Н.В. Аннотированный список рыбообразных и рыб морей Арктики и сопредельных вод // Вопросы ихтиологии. 1994. Т. 34. №4. С. 435-456.
- Артюкова Е.В., Холина А.Б., Козыренко М.М., Журавлев Ю.Н. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) на основе RAPD-маркеров // Генетика. 2004. Т. 40. №7. С. 877-884.
- Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // ЖОБ. 2004. Т. 65. №4. С. 278-305.
- Вейр Б. Анализ генетических данных. М.: Мир, 1995. 400 с.
- Дмитриев Н.А. Биология и промысел сельди в Белом море. М.: Пищепромиздат, 1946. 88 с.
- Дружинин А.Д. Миграция сельди в водах Сахалина по данным опытов мечения 1956-1958 гг. // Рыбное хозяйство. 1959. №9. С. 17-22.
- Картавцев Ю.Ф., Рыбникова И.Г. Генетическое и морфобиологическое исследование популяций тихоокеанской сельди, *Clupea pallasii*, из Японского и Охотского морей // Генетика. 1999. Т. 35. №8. С. 1093-1103.
- Клонирование ДНК. Методы.: Пер. с англ./Под ред. Д. Гловера. М.: Мир, 1988. 538 с.
- Мельников И.В., Воробьев П.В. Распределение и миграции неполовозрелой сельди в северной части Охотского моря // Вопросы рыболовства. 2001. Т. 2. С. 403-421.
- Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Наймарк Е.Б. Анализ динамики популяций сельди Белого моря // Вопросы ихтиологии. 1992. Т. 32. Вып. 5. С. 72-77.
- Наймарк Е.Б., Фролов С.Б. Моделирование популяций беломорской сельди *Clupea pallasii marisalbi* // Вопросы ихтиологии. 1993. Т. 33. №3. С. 359-366.
- Науменко Н.И. Биология и промысел морских сельдей Дальнего Востока. Петропавловск-Камчатский: Камчатский печатный двор, 2001. 330с.
- Радченко В.И., Глебов И.И. Состояние запасов и перспективы промысла охотской сельди // Рыбное хозяйство. 1995. №3. С. 23-27.
- Рыбникова И.Г. Популяционно-генетическая структура сельдей Охотского моря // Сельдевые северной части Тихого океана. Владивосток: ТИНРО, 1985. С. 57-63.
- Рыбникова И.Г. Популяционная структура тихоокеанской сельди *Clupea pallasii* (Valenciennes) Японского и Охотского морей. Автореф. канд. дисс. Владивосток: ДГТРУ, 1999. 23 с.
- Смирнов А.А., Марченко С.Л., Кащенко Е.В. Оценка популяционного статуса сельди Тауйской губы Охотского моря по результатам морфометрического анализа 2001-2002 гг. // Тез. докл. VI науч. конф.: «Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей». Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс, 2005. С. 253-255.

- Хедрик Ф.* Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 592 с.
- Fisher R.A.* The Genetics Theory of Natural Selection. Oxford, Clarendon Press. 1930. 272 p.
- Hadrys H., Balik M., Schierwater B.* Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology // *Mol. Ecol.* 1992. V. 1. Pp. 55-64.
- Kimura M., Crow J.F.* The number of alleles that can be maintained in a finite population // *Genetics.* 1964. V. 49. Pp. 725-738.
- Lee S.-W., Ledig F.T., Johnson D.R.* Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the White Mountines, California // *Am. J. Bot.* 2002. V. 89. Pp. 566-577.
- Manly B.F.J.* The statistics of natural selection. Chapman and Hall, London. 1985. Pp. 272-282.
- Miller M.P.* Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Computer software distributed by author.
- Nagylaki T.* Fixation indices in subdivided populations // *Genetics.* 1988. Pp. 1325-1332.
- Nei M.* Genetic distance between populations // *Amer. Natur.* 1972. V. 106. Pp. 283-292.
- Nei M.* Analysis of gene diversity in subdivided populations // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* Dec. 1973. V. 70. №12. Part I. Pp. 3321-3323.
- Rousset F., Raymond M.* Testing heterozygote excess and deficiency // *Genetics.* 1995. V. 140. Pp. 1413-1419.
- Vucetich L.M., Vucetich J.A., Joshi C.P., Waite T.A., Peterson R.O.* Genetic (RAPD) diversity in *Peromyscus maniculatus* populations in a naturally fragmented landscape // *Mol. Ecol.* 2001. V. 10. Pp. 35-40.
- Yeh F.C., Boyle T.J.B.* Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // *Belgian J. Bot.* 1997. V. 129. P. 157.

**GENETIC DIFFERENTIATION OF NORTHERN OKHOTSK SEA
GROUPING OF PACIFIC HERRING *CLUPEA PALLASII* VALENCIENNES,
1847 (CLUPEIDAE; CLUPEIFORMES) AS ASSESSED BY RAPD MARKERS**

© 2008 y. A.G. Lapinski¹, A.A. Smirnov², V.V. Gorbachev¹, L.L. Solovenchuk¹

*1 – Institute of the Biological Problems of the North, Russian Academy of Sciences,
Far-Eastern Branch, Magadan*

2 – Magadan Research Institute of Fisheries and Oceanography, Magadan

The genetic characteristics of Okhotsk, Gizhiga-Kamchatka, and bay of Tauysk samplings, representing the northern Okhotsk sea groupings of Pacific herring were studied by means of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. The studied groupings were highly differentiated and possessed significant genetic diversity as well as presumably non-neutral loci. The bay of Tauysk grouping happened to be closer to that of Gizhiga-Kamchatka, both being more diverse genetically than the Okhotsk grouping.