

**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ КУМЖИ
SALMO TRUTTA РЕК СЕВЕРО-ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ ЧЕРНОГО МОРЯ**
© 2013 г. Н. А. Небесихина¹, Н. Н. Тимошкина¹, А. Е. Барминцева², С. Б. Туниев³,
М. Л. Гогуа⁴

*Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства,
Ростов-на-Дону, 344002*

²*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и
океанографии, Москва, 107140*

³*Сочинский национальный парк, 354000*

⁴*Институт экологии АН Абхазии, Сухум, 384905*

E-mail: nebo_N-71@mail.ru

Поступила в редакцию 26.12.2013 г.

Исследована популяционная структура кумжи *Salmo trutta*. Проанализирован полиморфизм восьми выборок кумжи, нерестящихся в реках черноморского побережья России и Абхазии, по семи микросателлитным локусам и нуклеотидной последовательности Д-петли митохондриальной ДНК (474 п.н.). Сравнительный анализ показал достоверную генетическую дифференциацию между большинством групп кумжи по микросателлитным маркерам и одновременно гомогенность по последовательности мтДНК.

Ключевые слова: STR, митохондриальная ДНК (мтДНК), *Salmo trutta*, генетический полиморфизм.

ВВЕДЕНИЕ

Черноморская кумжа *Salmo trutta* – ценный промысловый представитель семейства лососевых Salmonidae, включающий проходную (черноморский лосось) и жилую (ручьевая форель) формы, которые в ряде случаев образуют единое нерестовое стадо.

Вид всегда был немногочисленным и промысловой статистикой не учитывается. Существуют отрывочные данные по уловам проходной кумжи на территории Республики Абхазия за период 1936–1958 г. Объем добычи в эти годы варьировал от 0,435 (95 шт.) до 8,98 т (2205 шт.). Увеличение численности связано с эффективной воспроизводственной работой, проводимой в этот период на Чернореченском лососевом рыбноводном заводе (ЧЛРЗ), когда объемы выпуска молоди составляли 34–540 тыс. шт. (Барач, 1962).

В последнее десятилетие численность популяции проходной формы черноморской кумжи снизилась, что повлекло за собой придание этому виду статуса охраняемого таксона. В реках черноморского побережья отмечаются единичные заходы производителей на нерест. Для поддержания численности популяции черноморского лосося проводится выпуск молоди, получаемой от производителей кумжи на двух рыбноводных предприятиях Краснодарского края, и предпринимаются попытки возобновить работы по выпуску молоди на ЧЛРЗ в Абхазии. В этой связи изучение генетической структуры популяции кумжи, разработка критериев видовой идентификации и биотехнических требований к производителям, используемым в искусственном воспроизводстве, становится актуальной задачей.

Ранее европейские крупномасштабные исследования генетического разнообразия кумжи с использованием ДНК-маркеров показали, что этот вид генетически

и географически высоко структурирован (Cortey et al., 2004). По данным анализа митохондриальной ДНК (мтДНК) девяти особей, черноморская кумжа отнесена к дунайской филогенетической группе, где она представлена четырьмя гаплотипами, два из которых отмечены в реках Абхазии (Осинов, Берначе, 1996; Bernatchez, 2001).

В настоящее время анализ, основанный на изменчивости микросателлитной ДНК, является наиболее объективным методом оценки генетической дивергенции популяций лососевых рыб (Apostolos et al., 2008; Sourinejad et al., 2011).

Популяционно-генетическая структура кумжи, обитающей в реках Краснодарского края и республики Абхазия, с применением STR-анализа до настоящего времени не изучена, а анализ мтДНК проведен на скудной выборке из двух рек Абхазии. Цель настоящей работы – определить популяционно-генетические характеристики черноморской кумжи по данным секвенирования контрольного участка мтДНК (Д-петля) и анализу изменчивости по семи микросателлитным локусам (STR).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Черноморский лосось. Материалом исследования служили выборки особей кумжи, отобранных в период контрольно-наблюдательных ловов, проводимых ФГУП «АзНИИРХ» в Черном море в 2009–2012 г.; производители были из ремонтно-маточных стад (РМС), участвующие в рыбоводном процессе в 2011 г. на Адлеровском производственно-экспериментальном рыбоводном лососевом заводе (АПЭРЛЗ) ФГБУ «Азчеррыбвод». Изучали также молодь кумжи, полученную на племзаводе ФГУП «Адлер» в 2011 г. и переданную в Абхазию на ЧЛРЗ (часть партии этой кумжи была выпущена в реки Мчишта и Бзыбь, другая оставлена для формирования собственного РМС).

Ручьевая форель. Материал был отобран в летне-осенний период 2009–2012 г. в бассейнах рек Шахе, Псезуапсе, Аше, Кодор и Том.

Также в качестве внешней группы была использована выборка беломорской кумжи, которую выловили во время нерестового хода в р. Индера в 2010 г.

Весь собранный материал отобран у рыб прижизненно. Места отбора проб представлены на рисунке. Реестр выборок и количество проанализированного материала представлены в табл. 1.

Выделение ДНК проводили солевым методом (Aljanabi et al., 1999) из плавников, хранившихся в 96%-ном этаноле. Для определения нуклеотидной последовательности Д-петли мтДНК амплифицировали участок длиной 474 п.н. с использованием праймеров HN20 и Tpro2 (Brunner et al., 2001). Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе «ABI PRIZM 3130».

Обработку первичных данных и расчет генетических дистанций между выборками проводили в программе Mega 5.05 (Tamura et al., 2011).

STR-генотипирование проводили по семи локусам (*Ssa197*, *Ssa408*, *Sssp2216*, *Str85*, *Str543*, *Str15*, *Strutta17*), ранее использованным в анализе средиземноморской и каспийской кумжи (Estoup et al., 1993; O'Reilly et al., 1996; Cairney et al., 2000; Paterson et al., 2004; Gharbi et al., 2006). Локусы были амплифицированы в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Продукты амплификации разделяли с помощью капиллярного электрофореза на автоматическом секвенаторе «ABI PRIZM 3130». Полученные первичные данные обрабатывали с помощью



Рис. 1. Места отбора проб черноморской кумжи.

Fig. 1. Sampling locations of brook trout.

Таблица 1. Характеристики исследованных выборок кумжи

Table 1. The sampling locations and parameters of the samples studied

№ п/п	Место отбора проб	Условное обозначение выборки	Число проанализированных особей	
			Д-петля	STR
1	Черное море (территориальные воды РФ)	BlackS	8	12
2	Бассейн р. Шахе, РФ	ShR	28	28
3	Бассейн р. Псезуапсе, РФ	PsezR	17	18
4	Бассейн р. Аше, РФ	AsheR	18	18
5	РМС (АПЭРЛЗ) ФГБУ «Азчеррыбвод»	MzimRMS	39	39
6	ЧЛРЗ, р. Мчишта, Абхазия	ChRMS	10	10
7	Бассейн р. Кодор, Абхазия	KodorR	4	5
8	Бассейн р. Том, приток р. Ингур, Абхазия	TomR	5	24
9	Бассейн р. Индера, Белое море, РФ	WS	14	14

Примечание: РМС (АПЭРЛЗ) – ремонтно-маточное стадо (Адлеровский производственно-экспериментальный рыболовный лососевый завод); ЧЛРЗ – Чернореченский лососевый рыболовный завод.

Note: РМС – Broodstock; АПЭРЛЗ - Pilot salmon-breeding farm in Adler; ЧЛРЗ – Chernorechensk salmon-breeding farm.

программы «GeneMarker» (SoftGenetics LLC.). Частоты аллелей, ожидаемую и наблюдаемую гетерозиготность определяли в программе Genepop v. 4.2. (Raymond, Rousset, 1995; Rousset, 2008); в программе BOTTLENECK, версия 1.2.02 (Cornuet, Luikart, 1996) проверяли наличие возможного эффекта «бутылочного горлышка».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полиморфизм региона Д-петли мтДНК черноморской кумжи

Для 121 особи кумжи была определена нуклеотидная последовательность контрольного участка мтДНК длиной 474 п.н. В данной выборке выявлено четыре гаплотипа (BS-1, BS-2, BS-3, BS-4), различающихся по пяти нуклеотидным сайтам (табл. 2). Следует отметить, что гаплотипы BS-1 и BS-2 наблюдаются как у особей кумжи, так и у ручьевой форели, причем частота встречаемости гаплотипа BS-2 несколько выше и составляет 67,2%. Гаплотип BS-3 отмечен у одной особи ручьевой форели из р. Шахе, а гаплотип BS-4 – у одной особи кумжи из ЧЛРЗ.

Генетические дистанции показывают очень низкий уровень различий внутри черноморской популяции (0,002–0,005) по исследованной последовательности мтДНК. Наименьший уровень отличий (0,002) выявлен между рыбами из РМС АПЭРЛЗ и выборками ручьевой форели из рек Шахе и Псезуапсе. Наибольшие различия (0,007–0,012) отмечены между черноморской и беломорской популяциями.

В выборках черноморской кумжи отсутствует достоверное различие между составом гаплотипов мтДНК. Выявлена достоверная кластеризация между черноморской и беломорской кумжей, соответствующая географической разобщенности этих популяций. Кроме того, полученные данные не дифференцируют проходную и пресноводные формы черноморской кумжи.

Таблица 2. Вариабельные сайты участка митохондриальной ДНК (Д-петля), выявленные у черноморской кумжи

Table 2. Variable sites detected in four mtDNA haplotypes (D-loop)

Гаплотип	Частота встречаемости, %	Вариабельный сайт (позиция)				
		36	39	165	166	321
BS – 1	31,2	T	A	G	A	C
BS – 2	67,2	T	G	A	G	C
BS – 3	0,8	A	G	A	G	C
BS – 4	0,8	T	A	G	G	T

Микросателлитный анализ черноморской кумжи

Всего по семи локусам идентифицирован 101 аллель. В исследуемой выборке черноморских лососевых наименее полиморфным был локус *Str85*, для него зафиксировано четыре аллеля и наименьшее значение гетерозиготности – 0,320. Наиболее полиморфными оказались локусы *Sssp2216* и *Ssa408* с 18 и 20 аллелями на локус соответственно. Во всех случаях зафиксировано снижение наблюдаемой гетерозиготности по сравнению с ожидаемой (таб. 3).

Таблица 3. Характеристика полиморфизма кумжи по микросателлитным локусам
Table 3. Characteristics of brook trout polymorphism by microsatellite loci

Локус	Выборка, число экз.	Число аллелей	Гетерозиготность	
			наблюдаемая	ожидаемая
<i>Ssa197</i>	123	12	0,699	0,823
<i>Ssa408</i>	109	20	0,706	0,914
<i>Sssp2216</i>	123	18	0,870	0,909
<i>Str85</i>	122	4	0,320	0,393
<i>Str543</i>	119	14	0,664	0,814
<i>Strutta17</i>	122	11	0,811	0,864
<i>Str15</i>	106	8	0,623	0,796

В целом аллельное разнообразие было выше в черноморской выборке по сравнению с беломорской. Это наблюдение нельзя полностью объяснить более представительной выборкой кумжи из Черного моря, так как набор аллелей был богаче и при сравнении беломорской ($n = 15$) и, например, абхазской группы ($n = 19$).

Различия между каждой парой популяций по частоте распределения аллелей определяли в тесте Фишера, сравнивая вероятностные значения для каждой пары популяций по всем локусам или генотипам. За исключением одной пары остальные имели существенно различающиеся распределения частот аллелей ($p < 0,001$). В попарном сочетании особей из Чёрного моря и р. Псезуапсе различия были незначительными.

В соответствии с такой высокой генетической неоднородностью величины F_{ST} для всех популяций также оказались значительно структурированными (табл. 4). Значения F_{ST} между черноморскими группами и беломорской популяцией ожидаемо были выше.

Вычисленные по наблюдаемому числу аллелей значения наблюдаемого и ожидаемого генного разнообразия для каждой выборки кумжи были использованы для трех тестов на наличие «эффекта бутылочного горлышка». Из восьми выборок для двух – из рек Шахе и Псезуапсе – определили значимый избыток гетерозиготности для моделей IAM и TPM по двум тестам ($p < 0,01$). Однако качественный

Таблица 4. Величины F_{ST} по данным STR-анализа
Table 4. The values of F_{ST} according to STR-analysis data

	AsheR	BlakS	ChRMS	MzimRMS	PsezR	ShR	TomR
BlakS	0,00102						
ChRMS	0,03373	0,03297					
MzimRMS	0,03843	0,006056	0,03118				
PsezR	0,01814	-0,00868	0,04286	0,04553			
ShR	0,01688	0,0126	0,06125	0,03422	0,01959		
TomR	0,08586	0,05157	0,08194	0,05714	0,09829	0,09907	
WS	0,2997	0,3122	0,367	0,2992	0,3002	0,286	0,3994

метод плотности распределения аллелей не выявил ни в одной популяции достоверных отклонений от равновесной популяции.

Межгрупповое дифференцирование черноморской кумжи по данным двух ДНК-маркеров

Полученные данные по нуклеотидной последовательности Д-петли черноморского лосося выявили четыре гаплотипа, два из которых встречаются как у проходной, так и у пресноводной форм кумжи, и по одному уникальному гаплотипу – у каждой формы кумжи.

В то же время микросателлитный анализ продемонстрировал существенную генетическую структурированность и значимые различия между выборками. Сравнение полученных данных по двум ДНК-маркерам говорит об отсутствии генетической дифференциации в черноморской популяции кумжи по последовательности мтДНК и о выявленной генетической дифференциации популяции при всех попарных сравнениях распределения аллельных частот STR.

Исследуемые популяции черноморской кумжи, будучи малочисленными и изолированными, подвержены высокому риску исчезновения. По этой причине настоятельно требуется реализация мероприятий по сохранению популяции с учетом ее генетической дифференциации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Барач Г.П. Черноморская кумжа (лосось-форель). Тбилиси: Изд-во АН ГрузССР, 1962. 110 с.

Осинов А. Г., Берначе Л. «Атлантическая» и «дунайская» филогенетическая группы кумжи *Salmo trutta* complex: генетическая дивергенция, эволюция, эволюция, охрана // Вопр. ихтиологии. 1996. Т. 36. № 6. С. 762–784.

Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. 1999. V. 25. № 22. P. 4692–4693.

Apostolos P. A., Madeira M.-J., Hansen M. M., Machordom A. Genetic structure and demographic history of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the southern Balkans // Freshwater Biol. 2008. № 53. P. 1555–1566.

Bernatchez L. The evolutionary history of brown trout *Salmo trutta* L. inferred from phylogeographic, nested clade and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation // Evolution. 2001. V. 55. №. 2. P. 351–379.

Brunner P. C., Douglas M. R., Osinov A. G. et al. Holarctic phylogeography of arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences // Ibid. 2001. V. 55. №. 3. P. 573–586.

Cairney M., Taggart J. B., Hoyheim B. Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids // Mol. Ecol. 2000. №. 9. P. 2175–2178.

Cornuet J. M., Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data // Genetics. 1997. №.144. P. 2001–2014.

Cortey M., Pla C., Garcia-Marin J. Historical biogeography of Mediterranean trout // Mol. Phylogen. Evol. 2004. №. 33. P. 831–844.

Estoup A., Presa P., Krieg F. et al. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. // *Heredity*. 1993. №. 71. P. 488–496.

Gharbi K., Gautier A., Danzmann R. G. et al. A linkage map for brown trout (*Salmo trutta*): chromosome homeologies and comparative genome organization with other salmonid fish // *Genetics*. 2006. №. 172. P. 2405–2419.

O'Reilly P. T., Hamilton L. C., McConnell S. K., Wright J. M. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1996. №. 53. P. 2292–2298.

Paterson S., Piertney S. B., Knox D. et al. Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites // *Mol. Ecol.* 2004. №. 4. P. 160–162.

Raymond M., Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism // *Heredity*. 1995. №. 86. P. 248–249.

Rousset F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux // *Mol. Ecol.* 2008. №. 8. P. 103–110.

Sourinejad I., Kalbassi M. R., Pino-Querido A. et al. Parentage assignment of progeny in mixed milt fertilization of Caspian brown trout *Salmo trutta caspius* using microsatellite DNA markers: Implications for conservation // *African J. Biotechnol.* 2011. V.10 (26). P. 5084–5090.

Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. №. 28. P. 2731–2739.

ASSESSMENT OF GENETIC VARIATION OF THE BROOK TROUT *SALMO TRUTTA* FROM THE RIVERS FLOWING INTO THE NORTH-EASTERN BLACK SEA

© 2013 y. N.A. Nebesikhina¹, N.N. Timoshkina¹, A.E. Barmintseva², S.B. Tuniev³, M.L. Gogua⁴

¹ Russian Federal Azov Fisheries Research Institute, Rostov-on-Don, 344002

² Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 107140

³ Sochi National Park, 354000

⁴ Institute of Ecology, Academy of Sciences of Abkhazia, Sukhum, 384905

The population structure and effect of artificial reproduction of *Salmo trutta* on the genofond of the species have been studied. We have analyzed the polymorphism of eight subsamples of brook trout spawning in the rivers of the Black Sea coast of Russia and Abkhazia by means of microsatellite markers and nucleotide sequence of mtDNA D-loop region (474 p.n.). Comparative analysis of microsatellite markers has revealed reliable genetic differentiation between most groups of brook trout and homogeneity of the same samples when mtDNA sequencing has been studied.

Keywords: STR, mitochondrial DNA (mtDNA), *Salmo trutta*, genetic polymorphism.