

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В ИСКУССТВЕННО СОЗДАННОЙ И ДОНОРНОЙ ПОПУЛЯЦИЯХ КЕТЫ (*ONCORHYNCHUS KETA* WALBAUM) РЕК КУЛЬКУТЫ И ЯМА (СЕВЕРНОЕ ПОБЕРЕЖЬЕ ОХОТСКОГО МОРЯ)

Л.Т. Бачевская, В.В. Переверзева

Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан, Россия,
e-mail: gekki54@mail.ru

Определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена *cytb* мтДНК у кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) из рек северного побережья Охотского моря Яма (донор) и Кулькуты (искусственно созданная популяция). Отмечен полиморфизм изученного молекулярного маркера. Показаны особенности генетической структуры кеты из исследованных локальностей. Значения нуклеотидного и гаплотипического разнообразия искусственно созданной популяции оказались более высокими по сравнению с показателями, характеризующими популяцию-донор. Вероятно, это связано с особенностями формирования генетической структуры кулькутинской популяции и определяется эффектом основателя. Кроме того, причиной отмеченного факта может быть стрейнинг, который повлиял на количественный и качественный составы гаплотипов искусственно созданной популяции кеты. По-видимому, гаплотипы, привнесенные в результате межпопуляционного обмена, успешно поддерживаются за счет искусственного воспроизводства, что привело к некоторому изменению генетического облика кулькутинской локальности относительно донорной популяции.

Ключевые слова: кета (*Oncorhynchus keta*), молекулярные маркеры, ген цитохрома *b*, мтДНК, популяционная генетика.

Введение

Материковое побережье Охотского моря является одним из основных районов воспроизводства тихоокеанских лососей, среди которых важное место занимает ценный промысловый вид – кета *Oncorhynchus keta* (Walbaum). Пополнение запасов этого вида в указанном регионе происходит с помощью естественного нереста и искусственного воспроизводства. Кроме этого, наряду с традиционной биотехникой искусственного разведения тихоокеанских лососей проводятся работы по созданию популяций, ранее не обитавших в тех или иных водоемах. Подобные популяции отличаются от акклиматизированных в первую очередь тем, что при заходе в реку в период нерестовой миграции они полностью изымаются из биотопа,

и размножение происходит только в условиях рыбоводного завода. Такой эксперимент имеет успех в Магаданской области. Для формирования популяции искусственного происхождения использовали половые продукты поздней нерестовой кеты р. Яма (материковое побережье Охотского моря) (1992–1995 гг.). Оплодотворенную икру инкубировали в заводских условиях. Полученную молодь перевозили в р. Кулькуты (ранее не заселенную этим видом) и содержали в выростных садках. Это способствовало формированию хоминга и обеспечивало ее возврат в указанный водоем. Заходящие на нерест в р. Кулькуты производители полностью вылавливались, а полученные от них половые продукты использовали в рыбоводных целях. В результате этого была сформирована «промыслово-маточная» кулькутинская популяция, ежегодные

подходы которой составляют от 600 до 7000 шт. (Сафроненков и др., 2005). При такой биотехнике популяция, созданная искусственным способом, не нарушает исторически сложившегося биотопа водоема, что весьма важно. Кроме того, эксплуатация искусственно созданных популяций дает возможность избежать проблем, возникающих в смешанных нерестовых стадах, состоящих из рыб естественного и искусственного происхождения. Тем не менее для них характерны негативные изменения, которые чаще всего связаны со снижением их генетического разнообразия (Омельченко и др., 2002). В процессе исследования структуры кулькутинской кеты использовали методы популяционной генетики, направленные на изучение аллозимной изменчивости и полиморфизма тотальной ДНК (метод RAPD). Отмечена тенденция к снижению ее генетического разнообразия, которая зафиксирована на фоне возрастающей численности сформированного стада (Бачевская и др., 2006; Бачевская, Лапинский, 2010). Для расширения информации о генетической структуре и процессах, протекающих в популяции кеты р. Кулькуты, использован наиболее современный метод определения нуклеотидных последовательностей генома, дающий исчерпывающую информацию о его строении. Был исследован фрагмент гена *cytb* мтДНК. Полиморфизм гена *cytb* мтДНК представляет интерес при различных внутри- и межпопуляционных исследованиях (Радченко и др., 1997; Шпигальская и др., 2009; Бачевская, Переверзева, 2010). На основе анализа полученных данных проведена оценка генетического разнообразия и степени дивергенции искусственно созданной кулькутинской и донорной ямской популяций кеты.

Материалы и методы

В основу работы положены материалы, собранные в 2008 г. Исследовано 70 особей кулькутинской и 87 – ямской кеты. Выделение и очистка ДНК проводились по модифицированному методу Флеминга и Кука (Fleming, Cook, 2002). Участок гена *cytb* митохондриального генома амплифицировался с использованием праймеров Lk14735 (5'- AAAAACCACCGT TGTТAT TCAACTA-3') и H15149ad (5'- GCICCTCARAATGAYATTTGTCT-3').

Полимеразная цепная реакция проводилась по методике, описанной Расселлом (Russell *et al.*, 2000). Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов мтДНК осуществляли по стандартной методике с применением наборов для циклического секвенирования ДНК Big Dye Terminator (Applied Biosystems, V. 3.1) и генетического анализатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Все нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank. Их номера представлены в табл. 1. Статистическая обработка полученных данных (в том числе расчет нуклеотидного разнообразия – π) проводилась с использованием пакета программ MEGA-4 (Tamura *et al.*, 2007). Оценивали генетическое (гаплотипическое) разнообразие H (Nei, 1973). Статистическую достоверность различий частоты встречаемости выявленных гаплотипов рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента (Животовский, 1991). В процессе работ применяли программу ARLEQUIN 3.0. (Excoffier *et al.*, 2005). Оценка соответствия характера нуклеотидных замен гипотезе нейтральности в обследованных популяциях для использованного маркера проводилась с помощью теста D. Тадзимы (Tajima, 1989). Медианную сеть, связывающую наблюдаемые гаплотипы, строили с помощью Network 4.5.1.0 (Bandelt *et al.*, 1999).

Таблица 1

Частота распределения гаплотипов фрагмента гена *cytb* мтДНК в популяциях кеты рек Кулькуты и Яма (материковое побережье Охотского моря)

Гаплотипы	№ GenBank	Локальность	
		р. Кулькуты	р. Яма
Частота гаплотипов			
B1	FJ887836	0,6143	0,7356
B3	FJ887843	0,1286	0,0690
B5	FJ887839	0,0143	0,0000
B7	FJ887847	0,1571	0,1379
B8	FJ887846	0,0571	0,0230
B10	GQ131428	0,0143	0,0115
B11	GQ131426	0,0000	0,0115
B17	GU251076	0,0143	0,0000
B22	JF791691	0,0000	0,0115

Результаты и обсуждение

Определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена *cytb* мтДНК у кеты из рек Яма и Кулькуты. Изученный фрагмент содержит 395 пар нуклеотидов (п.н.) и соответствует положению 15396–15790 п.н. полного генома мтДНК кеты (GenBank, EF105341); 15396 п.н. соответствует 19 п.н. гена *cytb* кеты (Chang *et al.*, 2007). Положения варьируемых нуклеотидов приведены на рис. 1 в сравнении с нуклеотидной последовательностью гаплотипа В1 (GenBank FJ887836). При анализе нуклеотидных последовательностей обнаружены замены только в третьем положении кодона гена *cytb* (рис. 1).

	2233333
	87702389
	40364640
В1	TATGTA GA
В3 С . . .
В5	. G
В7	. . . А
В8	. . . А . G . .
В10	С
В11 А .
В17	. . С
В22 G

Рис. 1. Гаплотипы фрагмента гена *cytb* мтДНК популяций кеты из рек Яма и Кулькуты.

Такое проявление вполне закономерно. Известно, что третий нуклеотид большинства кодонов в транслируемых участках гена наиболее вариабелен из-за вырожденности кода (Zardoya, Meyer, 1996).

В исследованных популяциях кеты отмечен полиморфизм гена *cytb* мтДНК. Обнаружено 9 гаплотипов, при этом из 9 вариантов лишь 5 были общими для обеих популяций (табл. 1). Отмечено характерное для морских видов рыб распределение гаплотипов, т. е. небольшое их число имели высокую частоту, другие варианты встречались редко или были уникальными (Avise, 1994). В данном случае всего два гаплотипа представлены в выборках с относительно высокой частотой. У кеты р. Яма выявлены гаплотипы В11 и В22, отсутствующие в кулькутинской выборке (табл. 1). Вероятно, этот факт связан с малочисленностью кулькутинской выборки

(70 шт.), в число которой не вошли носители указанных гаплотипов. Нельзя исключить также, что подобное проявление могло быть вызвано особенностями формирования кулькутинской популяции. Выше отмечено, что для ее создания использовались поздние (по срокам миграции) производители, т. е. в процессе формирования была задействована лишь часть генофонда ямской популяции-донора, которая имеет высокий уровень генетической гетерогенности, проявляющейся на протяжении всего срока нерестовой миграции (Макоедов, Бачевская, 1992). В то же время в искусственно созданной популяции кеты р. Кулькуты были выявлены уникальные варианты гаплотипов В5, В17, не обнаруженные в выборке производителей донорной популяции р. Яма. Ранее было показано, что вариант В5 встречался в выборке кеты из р. Ола, которая так же, как и р. Кулькуты, впадает в Ольский лиман. В свою очередь гаплотип В17 ранее был зарегистрирован в популяции кеты р. Армань (Тауйская губа Охотского моря) (Бачевская, Переверзева, 2010). Известно, что кета из различных водоемов генетически отличается друг от друга вследствие высокого «хomingа» – инстинкта дома, позволяющего производителям кеты возвращаться на нерест в родной водоем. Тем не менее некоторое количество особей кеты все же заходит в соседние водоемы. Отклонение от строгого хоминга, т. е. возврат для размножения не к местам рождения, а в другие водоемы, называется «стреингом» (англ. strey – сбиться с пути, заблудиться). Стреинг не нарушает хоминг, а является важнейшим эволюционным приобретением видов, которое позволяет им осваивать новые места обитания (Алтухов и др., 1997). Вполне вероятно, что появление в кулькутинской выборке вариантов В5 и В17 определяется стреингом, который характерен для тихоокеанских лососей. У кеты он составляет 3,6–8% (Медников и др., 1988; Варнавская, 2006). Величина стреинга, рассчитанная нами для кулькутинской кеты, сопоставима с приведенными выше значениями и составляет 2,8%.

По принципу минимального числа нуклеотидных замен в исследованном фрагменте гена цитохрома *b* мтДНК построена медианная сеть, отображающая характер взаимоотношений выявленных вариантов в генофондах популяций кеты рек Яма и Кулькуты (рис. 2).

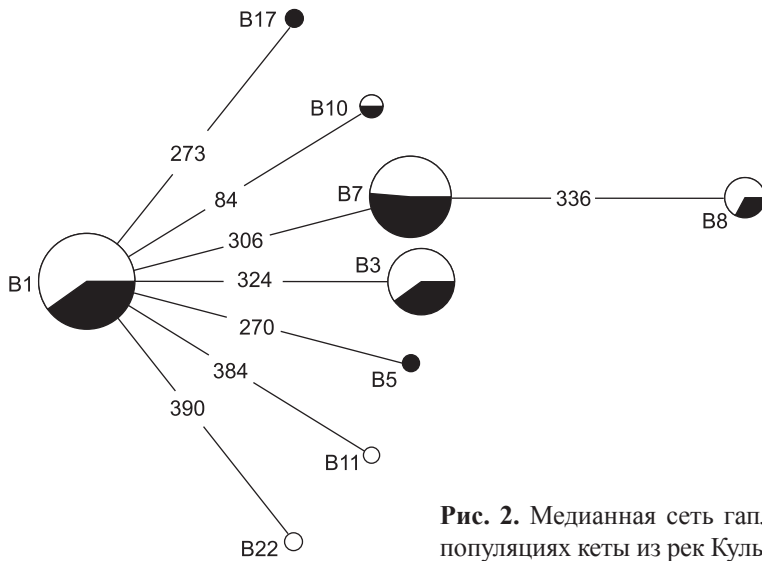


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов фрагмента гена *cytb* мтДНК в популяциях кеты из рек Кулькuty (черный цвет) и Яма (белый цвет).

Обнаруженные гаплотипы в выборках искусственно созданной и донорной популяций в основном происходят от варианта В1. Гаплотип В7 встречается с относительно высокой частотой в обеих популяциях (табл. 1). Последующая мутация в варианте В7 дала начало гаплотипу В8, который отличается от наиболее распространенного гаплотипа В1 двумя транзициями в третьей позиции кодона. Его можно отнести к числу относительно «частых» вариантов исследуемого фрагмента гена *cytb* мтДНК. Он отмечен в обеих популяциях, причем в кулькутинской выборке встречается в два раза чаще, чем в ямской – донорной. Кроме того, обращает на себя внимание увеличение (в два раза) частоты носителей гаплотипа В3 у кулькутинских производителей. Достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента (Животовский, 1991). Значения частот данного гаплотипа в выборках кеты из обеих популяций статистически достоверно различаются ($t = 3,89$; $p < 0,001$). Наблюдаемое увеличение значений частот гаплотипа В3 в искусственно созданной

популяции, по-видимому, может быть связано с особенностями формирования ее генетической структуры и, вероятнее всего, определяется эффектом основателя. Нельзя исключить также, что наблюдаемое распределение частот имеет стохастический характер. Так как численность донорной популяции кеты значительно выше, чем искусственно созданной, то и стохастические процессы в кулькутинской популяции могут быть более ярко выражены.

Как и ожидалось, рассчитанная величина межпопуляционной изменчивости (F_{sc}) исследованной кеты ничтожно мала – 0,02 %, а на долю внутривидовой генетической изменчивости (F_{ct}) приходится 99,98 %. Несколько неожиданными оказались данные, характеризующие уровень генетического разнообразия исследованных популяций. Так как при формировании кулькутинского стада использовалась лишь часть генофонда кеты р. Яма, то можно было предполагать возможность снижения генетического разнообразия в искусственно созданном кулькутинском стаде. Тем не менее

Таблица 2

Нуклеотидное и гаплотипическое разнообразие исследованных популяций кеты

Локальность	Количество	π	P_i	H	S	D
Яма	87	0,00131	0,51751	0,43923	6	-1,30015
Кулькuty	70	0,00194	0,76398	0,58587	6	-0,92271

Примечание. π – нуклеотидное разнообразие; H – гаплотипическое разнообразие; S – число вариабельных сайтов; P_i – среднее число парных различий между гаплотипами; D – коэффициент теста Tajima.

значения нуклеотидного (π) и гаплотипического (H) разнообразия в этой популяции кеты более высокие по сравнению с выявленными показателями у кеты р. Яма (табл. 2). Кроме того, в популяции кулькутинской кеты среднее число парных различий между гаплотипами исследованного фрагмента мтДНК несколько больше, чем в популяции-доноре. По-видимому, даже незначительный межпопуляционный обмен (2,8 %) повлиял на количественный и качественный составы гаплотипов кулькутинской кеты. Вероятно, в результате стрейнга привнесенные в нее гаплотипы успешно поддерживаются за счет искусственного воспроизводства, что привело к некоторому изменению генетического облика кулькутинской популяции относительно донорной. В то же время проведенный тест Таджимы (Tajima, 1989) показал отсутствие отклонения от нейтрального равновесия в исследованных популяциях. Это свидетельствует о том, что для формирования кулькутинской популяции кеты было использовано достаточное количество особей (сопоставимое с эффективной численностью), и она не испытывала эффекта «горлышка бутылки». Подобное предположение вполне согласуется с результатами анализа ранее опубликованных данных (Сафроненков, 2006), которые показывают, что за десятилетний период эксперимента по формированию кулькутинской популяции было использовано значительное количество оплодотворенной икры (не менее 16 млн шт.). Опираясь на данные по средней плодовитости североохотоморской кеты (2630 шт.) (Черешнев и др., 2002) и учитывая среднее значение процента возврата кулькутинских производителей (0,77 %) (Сафроненков, 2006), не сложно подсчитать количество рыб, использованных с рыбоводной целью. В среднем ежегодно брали для закладки на инкубацию икру от 608 особей, что вполне достаточно для поддержания генетического разнообразия популяций кеты (Алтухов и др., 1997). Тем не менее подобные популяции требуют постоянного наблюдения и мониторинга их генетического разнообразия. Для более детального исследования необходимо расширение спектра информативных генетических маркеров.

Исследования частично финансировались грантом ДВО РАН (ГрА 09-III-06-219, 2009-2011).

Литература

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с.
- Бачевская Л.Т., Лапинский А.Г. Генетические процессы в искусственно созданной популяции кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) р. Кулькуты (северное побережье Охотского моря) // *Вопросы рыболовства*. 2010. Т. 11. № 2(42). С. 241–250.
- Бачевская Л.Т., Лапинский А.Г., Соловечук Л.Л. Биохимический и RAPD – полиморфизмы у донорной и интродуцированной популяций кеты из рек Яма и Кулькуты (северное побережье Охотского моря) // *Вестник Северо-Восточного научного центра ДВО РАН*. 2006. № 1 (5). С. 61–66.
- Бачевская Л.Т., Переверзева В.В. Внутривидовой полиморфизм фрагмента гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК кеты (*Oncorhynchus keta* Walbaum) из рек восточной Камчатки и северного побережья Охотского моря // *Информ. вестник ВОГиС*. 2010. Т. 14. № 3. С. 537–545.
- Варнаевская Н.В. Генетическая дифференциация популяций тихоокеанских лососей. КамчатНИРО, 2006. 488 с.
- Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 269 с.
- Макоедов А.Н., Бачевская Л.Т. Генетические и фенетические особенности кеты разного времени нерестового хода // *Биология моря*. 1992. № 3/4. С. 62–68.
- Медников Б.М., Волобуев В.В., Горшков В.А. и др. Структура нерестовой кеты *Oncorhynchus keta* бассейна реки Тауй (по данным молекулярной гибридизации) // *Вопросы ихтиологии*. 1988. Т. 28. Вып. 5. С. 724–730.
- Омельченко В.Т., Салменкова Е.А., Рогатных А.Ю. Опыт оценки генетической изменчивости индустриальной популяции кеты, созданной в Магаданской области // *Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: Матер. науч. конф. П.-Камчатский*, 2002. С. 291–294.
- Радченко О.А., Малярчук Б.А., Соловечук Л.Л. Сравнительный рестрикционный анализ сегмента гена цитохрома *b* у кижуча, кеты и горбуши // *Генетика*. 1997. Т. 33. № 4. С. 471–474.
- Сафроненков Б.П., Хованская Л.Л., Волобуев В.В. Состояние лососеводства в Северном Охотоморье и пути его развития на ближайшую перспективу // *Рыбное хозяйство*. 2005. № 1. С. 43–47.
- Сафроненков Б.П. Современное состояние и перспективы искусственного разведения тихоокеанских лососей в Магаданской области // *Современные проблемы лососевых рыбоводных заводов*

- Дальнего Востока. Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: Матер. науч. конф. П.-Камчатский, 2006. С. 127–138.
- Черешнев И.А., Волобуев В.В., Шестаков А.В., Фролов С.В. Лососевидные рыбы Северо-Востока России. Владивосток: Дальнаука, 2002. 490 с.
- Шпигальская Н.Ю., Брыков В.А., Кухлевский А.Д. Полиморфизм мтДНК горбуши Камчатки и острова Сахалин // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана: Сб. науч. тр. Камчат. НИИ рыб. хоз. и океанографии. П.-Камчатский: КамчатНИРО, 2009. Вып. 13. С. 74–87.
- Avise J.C. *Molecular Markers // Natural History and Evolution*. N.Y.; London: Chapman and Hall, 1994. 511 p.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37–48.
- Chang H.-W., Tan K.-Y., Chou Y.C. EF105341 // *GenBank*. 2007.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinformatics Online*. 2005. V. 1. P. 47–50.
- Fleming M.A., Cook J.A. Phylogeography of endemic ermine (*Mustela erminea*) in southeast Alaska // *Mol. Ecol.* 2002. N 11. P. 795–807.
- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1973. V. 70. N 12. P. 3321–3323.
- Russell V.J., Hold G.L., Pryde S.E. *et al.* Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between Salmon species // *J. Agric. Food Chem.* 2000. N 48. P. 2184–2188.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 1596–1599.
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Gen. Soc. Am.* 1989. P. 585–595.
- Zardoya R., Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates // *Mol. Biol. Evol.* 1996. V. 13. N 7. P. 933–942.

**VARIABILITY OF MITOCHONDRIAL DNA CYTOCHROME *b* GENE
IN ARTIFICIAL AND DONOR POPULATIONS OF CHUM SALMON
(*ONCORHYNCHUS KETA* WALBAUM) FROM THE RIVERS KULKUTA
AND YAMA (THE NORTHERN COAST OF THE SEA OF OKHOTSK)**

L.T. Bachevskaya, V.V. Pereverzeva

Institute of Biological Problems of the North, FEB RAS, Magadan, Russia,
e-mail: gekki54@mail.ru

Summary

Nucleotide sequence of mt DNA *cyt b* gene fragment was determined at chum salmon from the rivers Yama (donor) and Kulkuta (artificial population). Polymorphism of the studied molecular marker was noted. Peculiarities of genetic structure of chum salmon from the studied localities were shown. Values of nucleotide and haplotype diversity of artificial population appeared to be higher comparing to those, of donor population. This probably is connected with formation peculiarities of genetic structure of the Kulkuta population and determined by effect of founder. This fact can be caused by straying (interpopulation exchange) that influenced the quantitative and qualitative haplotype composition of the artificial Kulkuta population of chum salmon. Haplotypes, added as a result of interpopulation exchange, probably, are successfully supported due to artificial reproduction that led to some change of genetic aspect of the Kulkuta locality, comparing to the donor population.

Key words: chum salmon (*Oncorhynchus keta*), molecular marker, cytochrome *b* gene, mtDNA, population genetics.