

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ  
НЕКОДИРУЮЩИХ И КОДИРУЮЩИХ  
УЧАСТКОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ИСКУССТВЕННО  
СОЗДАННОЙ ПОПУЛЯЦИИ КЕТЫ *ONCORHYNCHUS KETA*  
(WALBAUM) Р. КУЛЬКУТЫ (СЕВЕРНОЕ ПОБЕРЕЖЬЕ  
ОХОТСКОГО МОРЯ)**

**А.Г. Лапинский**

*Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, ул. Портовая, 18,  
Магадан, 685000, Россия. E-mail: agl@ibpn.ru*

Изучен полиморфизм некодирующего (фрагмент контрольного региона) и кодирующего участков митохондриальной ДНК в искусственно созданной (р. Кулькуты) и донорной (р. Яма) популяциях кеты. Отмечено несоответствие в соотношении уникальных гаплотипов, показателей нуклеотидного и гаплотипического разнообразия в сравниваемых выборках в зависимости от используемого маркерного участка, что объясняется процессами генетического дрейфа, особенно выраженными в популяциях с низкой эффективной численностью. В пользу этого предположения говорят сходные соотношения значений коэффициента теста Тадзимы и уровней межпопуляционного и внутривидового разнообразия независимо от используемого маркера.

**MOLECULAR-GENETIC VARIABILITY OF CERTAIN  
NON-CODING AND CODING REGIONS OF MITOCHONDRIAL  
DNA IN ARTIFICIAL POPULATION OF CHUM SALMON  
*ONCORHYNCHUS KETA* (WALBAUM) FROM KUL'KUTY RIVER  
(SEA OF OKHOTSK, NORTHERN COAST)**

**A.G. Lapinski**

*Institute of Biological Problems of the North Russian Academy of Sciences, Far East  
Branch, 18 Portovaya Str., Magadan, 685000, Russia. E-mail: agl@ibpn.ru*

The polymorphisms of non-coding and coding regions of mitochondrial DNA in artificial and donor populations of chum salmon from Kul'kuty and Yama rivers, respectively, were studied. The inconsistency in the proportion of unique haplotypes and parameters of nucleotide and haplotype diversities between populations depending on the region used were found and attributed to gene drift in chum salmon populations due to their low effective size. Such conclusion was substantiated by uniform interrelations of Tajima's  $D_s$  and levels of inter- and intrapopulation variabilities of studied populations irrespectively of the region used.

Оценка генетического разнообразия популяций кеты может иметь как теоретическое, так и прикладное значение для рациональной организации рыбоводства и промысла (Алтухов, 1995). Искусственно созданная популяция может служить моделью для изучения генетических процессов в них происходящих. Такой моделью является популяция кеты р. Кулькуты, в которой прежде этот вид не существовал. Ее характеризует изначально меньший, по сравнению с донорной популяцией р. Яма, исходный генофонд. Оценка генетического разнообразия кулькутинской популяции в сравнении с донорной, проводилась неоднократно. Для этой цели использовались биохимические маркеры – продукты ядерных генов, кодирующих ферменты (Салменкова и др., 2007), а также биохимические маркеры совместно с маркерами – фрагментами ДНК, генерируемой в полимеразной цепной реакции с декамерными праймерами произвольной последовательности (RAPD-PCR) (Бачевская и др., 2006, Бачевская, Лапинский, 2010). В названных работах отмечена тенденция к снижению разнообразия в искусственно созданной популяции по сравнению с донорной, однако, сравнительный анализ генетической структуры указанных популяций (за исключением сопоставления уровней гетерозиготности) не проводился. В настоящей работе предпринята попытка использовать маркеры, ассоциированные не с ядерной или тотальной ДНК, а митохондриальные (мт) маркеры – некодирующий, примыкающий к 5'-концу фрагмент контрольного региона мтДНК длиной 524 пн, содержащий наибольшее число полиморфных сайтов региона (Sato et al., 2001). В качестве кодирующего маркера был взят участок мтДНК длиной 583 пн, содержащий фрагменты генов субъединицы III цитохромоксидазы и тРНК<sup>Arg</sup> и гены тРНК<sup>Gly</sup> и субъединицы 3 NADH-дегидрогеназы (Kim et al., 2007). Для анализа были взяты выборки кеты из р. Кулькуты (48 образцов) и р. Яма (50 образцов), собранные в 2007 г. Все генерированные в полимеразной цепной реакции фрагменты мт ДНК выравнивались и на основе сравнения их нуклеотидных последовательностей рассчитывались среднее нуклеотидное разнообразие  $P_i$  как среднее число парных различий между гаплотипами и гаплотипическое ( $h$ ) разнообразие по Nei (Nei, 1973). Для оценки соответствия характера нуклеотидных замен гипотезе нейтральности в обследованных популяциях для каждого маркера выполнялся тест D Тадзимы (Tajima, 1989)

Для стандартизации парных нуклеотидных различий использовалось «среднее» число парных различий  $\pi$ , рассчитываемое как среднее нуклеотидное разнообразие  $P_i$ , деленное на число сравниваемых пар. Также строились медианные сети, связывающие наблюдаемые гаплотипы посредством минимального числа мутаций между ними.

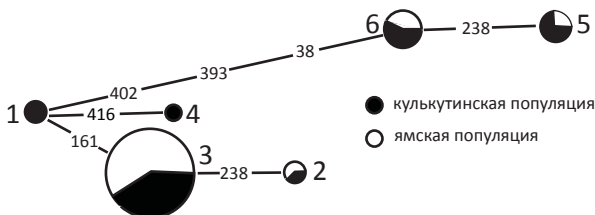


Рис. 1. Медианная сеть гаплотипов некодирующего участка. Цифры между гаплотипами – сайты мутаций.

В суммарной выборке из двух изученных популяций в некодирующем фрагменте было отмечено шесть полиморфных сайтов, из которых два оказались транзисиями, три – трансверсиями и один связан с делецией (рис. 1). Два гаплотипа из шести оказались уникальными только для кулькутинской

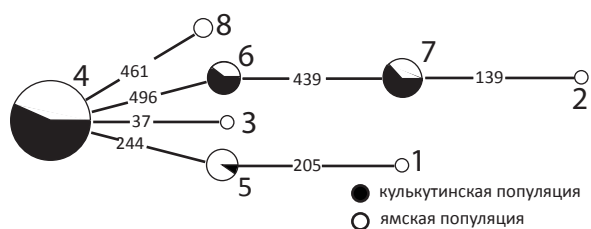


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов кодирующего участка

Цифры между гаплотипами – сайты мутаций.

выборки. В кодирующем фрагменте из семи полиморфных сайтов шесть различались транзциями и один – трансверсией. Из восьми гаплотипов лишь половина встречалась в обеих выборках, а другая половина – только в выборке из р. Яма (рис. 2).

Для кодирующего фрагмента показатели нуклеотидного и гаплотипического разнообразия

в донорной выборке выше, чем в искусственно созданной (табл.), как и можно было предполагать. Однако, при использовании в качестве маркера некодирующего фрагмента, эти показатели оказались выше в искусственно созданной популяции кеты. Причиной таких различий могут быть гомоплазии в полиморфных сайтах контрольного региона (напр. сайта 238 и, вероятно, сайтах 389, 393 и 402) (рис. 1). Подобные результаты отмечались при изучении популяций кеты северной Пацифики (Sato et al., 2004). Отмеченная гомоплазия может приводить к ошибочному заключению о низком генетическом разнообразии при использовании контрольного региона мтДНК для изучения популяций с низкой эффективной численностью, характерной для популяций лососевых (Waples, 1990). О длительном существовании популяций в условиях низкой численности может говорить и равное соотношение транзиций и трансверсий в контрольном регионе. В нашем случае численность кулькутинской популяции не достигает численности ямской, вследствие чего стохастические процессы в первой более выражены и вклад гомоплазий в полиморфных сайтах будет более заметным. Также стохастическими процессами, наряду с дрейфом генов, более выраженными в популяции с низкой численностью, можно объяснить наличие редких гаплотипов (1 и 4), присутствующих в кулькутинской выборке и отсутствующих в ямской (рис. 1). Учитывая их взаимосвязь с наиболее представленным в обеих выборках гаплотипом 3, относить их появление на счет межпопуляционного обмена (стрейнга) было бы неверно. В этой связи обращает на себя внимание, что соотношения значений коэффициента D теста Тадзимы для ямской и кулькутинской выборок однонаправлены независи-

Таблица

Показатели молекулярного разнообразия некодирующего и кодирующего участков мтДНК в донорной (р. Яма) и искусственной (р. Кулькуты) популяциях кеты

Река	Участок мтДНК	S	Pi	π	h	D
Яма	некодирующий	6	1,16700	0,00223	0,3518 ± 0,0823	0,07063
Кулькуты	некодирующий	6	1,98100	0,00378	0,6090 ± 0,0725	1,02355
Яма	кодирующий	7	1,18100	0,00202	0,7184 ± 0,0528	-0,64594
Кулькуты	кодирующий	7	0,83200	0,00142	0,5346 ± 0,0676	0.48278

Примечания: S – число вариабельных сайтов в исследуемом фрагменте мтДНК;

Pi – среднее число парных различий между гаплотипами; π – нуклеотидное разнообразие; h – гаплотипическое разнообразие; D – коэффициент теста Тадзимы.

мо от использованного маркера. Более низкие значения этого коэффициента в ямской выборке могут свидетельствовать о большей, по сравнению с кулькутинской, встречаемости редких полиморфизмов, что, вероятно, объясняется стабилизирующим отбором. Напротив, для кулькутинской популяции характерны невысокие уровни полиморфизмов, встречающихся как с высокой, так и с низкой частотой, что свидетельствует о снижении численности и/или балансирующем отборе. Анализ молекулярной изменчивости по всем сайтам (Excoffier et al., 1992) показал, что для контрольного региона 96,11 % всей изменчивости приходится на внутривидовую и 3,89 % на межвидовую, а для кодирующего 96,07 % и 3,93 % соответственно. Эти результаты сопоставимы с полученными нами при использовании маркеров RAPD (Бачевская и др., 2006, Бачевская, Лапинский, 2010). Таким образом, изученные маркеры могут быть использованы для дифференциации популяций кеты из разных локальностей. Однако их сегрегирующая способность в отношении генетически близких популяций весьма ограничена, в том числе и из-за низкой эффективной численности популяций.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Алтухов Ю.П. 1995.** Внутривидовое генетическое разнообразие: мониторинг и принципы сохранения // Генетика. Т. 31, № 10. С. 1331–1357.
- Бачевская Л.Т., Лапинский А.Г., Соловечук Л.Л. 2006.** Биохимический и RAPD-полиморфизмы у донорной и интродуцированной популяций кеты из рр. Яма и Кулькуты (северное побережье Охотского моря) // Вестник СВНЦ. №1. С. 61–66.
- Бачевская Л.Т., Лапинский А.Г. 2010.** Генетические процессы в искусственно созданной популяции кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) р. Кулькуты (северное побережье Охотского моря) // Вопросы рыболовства. №2. С. 241–250.
- Салменкова Е. А., Омельченко В. Т., Политов Д. В. Афанасьев К. И., Рубцова Г. А. 2007.** Генетическое разнообразие североохотоморских популяций кеты с естественным и искусственным воспроизводством // Биология моря. Т. 33, № 4. С. 299–308.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. V. 131, №2. P. 479–491.
- Kim G., Lee Y., Kang G., Kim C., Jung W., Seong K., Seeb J. E., Kim S., Kang S. 2007.** Genetic diversity and population structure of chum salmon in the North Pacific // North Pacific Anadromous Fish Commission. Bulletin. No. 4. P. 203–209.
- Nei M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. V. 70, №12. P. 3321–3323.
- Sato S., Ando J., Ando H., Urawa S., Urano A., and Abe S. 2001.** Genetic variation among Japanese populations of chum salmon inferred from the nucleotide sequences of the mitochondrial DNA control region // Zoological science. V. 18. P. 99–106.
- Sato S., Kojima H., Ando J., Ando H., Wilmot R. L., Seeb L. W., Efremov V., LeClair L., Buchholz W., Jin D.-H., Urawa S., Kaeriyama M., Urano A., Abe S. 2004.** Genetic population structure of chum salmon in the Pacific Rim inferred from mitochondrial DNA sequence variation // Environmental Biology of Fishes. V.69. P. 37–50.
- Tajima F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // Genetics. V. 123. P. 585–595.
- Waples R. S. 1990.** Conservation genetics of Pacific salmon. II. Effective population size and the rate of loss of genetic variability // Journal of Heredity. V. 81. P. 267–276.