

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГОРБУШИ
ONCORHYNCHUS GORBUSCHA (WALBAUM) ИЗ РЕК
СЕВЕРООХОТОМОРСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ
СЕКВЕНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА *CYTB***

Л.Т. Бачевская, В.В. Переверзева

*Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, ул. Портовая, 18, Магадан,
685000, Россия. E-mail: gekki54@mail.ru*

Определен полиморфизм гена цитохрома b у горбуши из нескольких североохотоморских популяций, что позволило оценить их генетическое разнообразие. Построена медианная сеть, отображающая мутационные различия между гаплотипами. Она имеет картину выраженной «звездчатой» радиации с единым «центром» G1. Отмеченный факт может свидетельствовать в пользу общего предкового генофонда исследованных популяций горбуши.

**GENETIC DIVERSITY OF HUMPBACK SALMON
ONCORHYNCHUS GORBUSCHA (WALBAUM) FROM THE
RIVERS OF THE NORTHERN PART OF THE SEA OF OKHOTSK
BASED ON THE RESULTS OF SEQUENCE ANALYSIS OF
MITOCHONDRIAL GENE *CYTB***

L.T. Bachevskaya, V.V. Pereverzeva

*Institute of Biological Problems of the North FEB RAS, 18 Portovaya Str., Magadan,
685000, Russia. E-mail: gekki54@mail.ru*

Polymorphism of cytochrome b gene at humpback salmon from several populations of the northern coast of the Sea of Okhotsk was determined, which allowed estimation of their genetic diversity. A median net was constructed reflecting mutation differences between haplotypes. It has the form of the evident starlike radiation with the single center G1. The mentioned fact supports the idea of common ancestry gene fond of the studied humpback salmon populations.

Данные об изменчивости митохондриальной ДНК (мтДНК) находят широкое применение в популяционных и эволюционных исследованиях видов тихоокеанских лососей. Не является исключением горбуша – один из наиболее многочисленных видов данного рода. Интерес к ее исследованию вполне оправдан, так как имеет теоретическую значимость для понимания эволюции вида и его современного состояния. Немаловажной является практическая направленность проводимых работ, связанная с проблемой идентификации и сертификации популяций.

В последнее время для популяционно-генетических исследований все чаще применяется метод определения нуклеотидных последовательностей генома, дающий исчерпывающую информацию об его строении. Подобный подход в исследовании мтДНК у горбуши представляется вполне перспективным. В настоящее время горбуша из рек северного побережья Охотского моря в данном направлении практически не изучена. В связи с этим, определен полиморфизм гена цитохрома *b* у горбуши из нескольких североохотоморских популяций, что позволило оценить их генетическое разнообразие.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследованы выборки горбуши из рек Тауйской губы Охотского моря: Ола, Яна, ручей Рассвет (о. Завьялова). Образцы мышечной ткани до обработки хранились в жидком азоте. Выделение и очистка ДНК проводилась по модифицированному методу Флеминга и Кука (Fleming, Cook, 2002). Участок гена цитохрома *b* (*Cytb*) митохондриального генома амплифицировался с использованием праймеров Lk14735: 5'- AAAAACCACCGTTGTTATTCААСТА-3' (Russell et al., 2000) и NbR: 5'-GAG CTA CTA GGG CAG GCT CA-3' (Miller et al.1998). Полимеразная цепная реакция проводилась по методике, описанной Миллером (Miller et al.1998). Выявление нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов мтДНК проведено по стандартной методике с использованием праймеров Lk14735 и NbR 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 (G1-G19, №1431951). Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ MEGA-4 (Tamura et al., 2006). Медианную сеть обнаруженных гаплотипов строили с помощью Network 4.5.1.0 (Bandelt et al., 1999). Нуклеотидное (π) и гаплотипическое (H) разнообразие рассчитывали по Неи (Nei, 1987), а также, с использованием пакета программ ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al., 2005).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определена нуклеотидная последовательность гена *Cytb* у североохотоморской горбуши из 3 популяций. Изученный фрагмент содержит 995 пар нуклеотидов и соответствует положению 15521–16516 пн (пар нуклеотидов) полного генома мтДНК горбуши (GenBank, GB NC010959, EF455489). В исследованных выборках обнаружено 19 гаплотипов, распределение которых соответствовало характерному для морских видов рыб (Avisе J.C., 1994). В данном случае всего несколько гаплотипов представлены в выборках с относительно высокой частотой, остальные редко встречались или вовсе были уникальными. Так, например, в выборке ольской горбуши обнаружены особи с характерными только для этой популяции гаплотипами: G12, G14, G15, G17. У производителей из р. Яна были выявлены варианты: G18, G19, а у горбуши, отловленной в ручье Рассвет: G4, G10, G11, G16. Частота распределений гаплотипов в исследованных популяциях представлена в таблице. Нуклеотидные замены в гаплотипах анализируемого фрагмента гена *Cytb* у горбуши из некоторых рек материкового побережья Охотского моря и о. Завьялова представлены на рис. 1. Отмечены 4 транзиции по первому нуклеотиду, 15 тран-

Таблица
**Распределение частот гаплотипов
фрагмента гена цитохрома b (Cytb)
мтДНК в популяциях горбуши**

Гапло- типы	Ола	Яна	Ручей Рассвет
	N=30	N=23	N=22
G1	0,4000	0,3043	0,2273
G2	0,0667	0,3043	0,0455
G3	0,1333	0,0000	0,2727
G4	0,0000	0,0000	0,3182
G5	0,0333	0,1304	0,0000
G6	0,0667	0,0435	0,0000
G7	0,0667	0,1400	0,0000
G8	0,0333	0,0435	0,0000
G9	0,0333	0,0435	0,0000
G10	0,0000	0,0000	0,0455
G11	0,0000	0,0000	0,0455
G12	0,0667	0,0000	0,0000
G13	0,0000	0,0435	0,0000
G14	0,0333	0,0000	0,0000
G15	0,0333	0,0000	0,0000
G16	0,0000	0,0000	0,0455
G17	0,0333	0,0000	0,0000
G18	0,0000	0,0435	0,0000
G19	0,0000	0,0435	0,0000

зиций по третьему нуклеотиду, 2 трансверсии по первому нуклеотиду, 1 трансверсия в третьей позиции кодона. Для исследованных популяций горбуши были рассчитаны величины нуклеотидного (π) и гаплотипического (H) разнообразия. По указанным параметрам проведен сравнительный статистический анализ ольской ($\pi = 0,001627$, $H=0,8255$), янской горбуши ($\pi = 0,002336$, $H=0,8017$) и производителей из ручья Рассвет ($\pi = 0,001459$, $H=0,8006$). Среди выборок, характеризующих три популяции горбуши, более низкие показатели нуклеотидного и гаплотипического разнообразия наблюдаются у производителей из ручья Рассвет. Тем не менее, статистически достоверных отличий между ними не обнаружено.

По принципу минимального числа нуклеотидных замен построена медианная сеть, отображающая мутационные различия между гаплотипами и показывающая характер взаимоотношений между ними в генофондах исследованных попу-

	112233	35 555 66 66 7	899 99
	4 578 478979	94 455 00 79 7	202 67
	0 858 472753	60 623 69 54 7	314 02
G1	GAACCTTACA	GTCAGGAGGG	ССААG
G2 G ^{###} C
G3 G ^{###}
G4 G ^{###} A
G5 G
G6 G ^{###} A
G7 C
G8 T
G9 G G
G10	A*^..A*^A.....
G11 GT
G12 G
G13 A*^..G ^{###} A
G14 G ^{###} A A
G15 G ^{###} A*^A
G16	A*^..A*^A..G ^{###}	T*
G17 G A A
G18	A*^G*^A.....G G	A*^A.G.
G19 G
GB EF455489 G ^{###} A
GB NC010959 G ^{###} A
GB FJ435608 G ^{###} A
GB FJ435607 G ^{###} T A

Рис. 1. Нуклеотидные замены в гаплотипах фрагмента гена цитохрома b мтДНК в выборках из североохотоморских популяций горбуши

Примечание. * Транзиции по первому нуклеотиду; Транзиции по третьему нуклеотиду; #Трансверсии по первому нуклеотиду; ## Трансверсии по третьему нуклеотиду. ^ Аминокислотная замена.

ЛИТЕРАТУРА

- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* V. 16. P. 37–48.
- Fleming M.A., Cook J.A. 2002.** Phylogeography of endemic ermine (*Mustela erminea*) in southeast Alaska // *Mol. Ecol.* № 11. P. 795–807.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005.** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // *Evol. Bioinformatics Online.* V.1. P. 47–50.
- Nei. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics.* N.Y.: Columbia Univ. Press. 512 p.
- Russell V.J., Hold G.L., Pryde S.E. et al. 2000.** Use of Restriction Fragment Length Polymorphism To Distinguish between Salmon Species // *J. Agric. Food Chem.* № 48. P. 2184–2188.
- Tamura K., Dudley J., Kumar S. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol. Evol.* V. 24. P. 1596–1599.
- Tajima F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics.* V. 123. P. 585–595.
- Miller S., Underwood T., Spearman W. J. 1998.** Genetic Assessment of Inconnu (*Stenodus leucichthys*) from the Selawik and Kobuk Rivers, Alaska, Using PCR and RFLP Analyses // *Alaska Fisheries Technical Report Number 48.* P. 1–13. Ссылка на методику и праймер NbR.