

ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ О ГЕНЕТИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ НАЛИМА (*Lota lota* L.) ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

© 2015 г. Ю. Я. Хрунык, А. В. Бородин, В. Л. Семериков, Л. Э. Ялковская, А. Р. Копориков,
С. Б. Ракитин, член-корреспондент РАН В. Д. Богданов

Поступило 01.04.2015 г.

На примере географически удаленных выборок оценено генетическое разнообразие налима (*Lota lota* Linneus, 1758) из Обь-Иртышского бассейна и его соответствие известнымкладам гаплотипов. Проведено секвенирование фрагмента контрольного региона митохондриальной ДНК из двух локалитетов (р. Иртыш в окрестностях г. Тобольск и р. Сось – левобережный приток р. Обь).

DOI: 10.7868/S0869565215230280

В настоящее время для изучения биоразнообразия и процессов внутри- и межвидовой дифференциации наряду с традиционными морфологическими используются молекулярно-генетические методы, которые позволяют не только оценить уровень генетического разнообразия, но и выявить филогенетические связи между отдельными региональными популяциями, детализировать процесс послеледниковой (ре)колонизации территории Евразии и Северной Америки. Налим (*Lota lota* Linneus, 1758) – циркумполярный вид, – является прекрасной моделью для подобных исследований [1, 2]. Предполагается, что разнообразие налима связано с геологической историей отдельных регионов Голарктики, а формирование ареала номинативного подвида (*L. l. lota*) шло в послеледниковое время в процессе формирования современных речных систем.

Исходя из логики распределения митохондриальных гаплотипов налима, выявленных в предыдущих исследованиях, Западная Сибирь рассматривается как транзитный регион распространения налима из Европы в Сибирь в послеледниковое время [1] и, следовательно, здесь ожидаемы гаплотипы наиболее широко распространенной Евразийской клады (рис. 1).

С другой стороны, палеонтологические данные указывают на важность данного региона в формировании биоты Евразии на протяжении всего четвертичного периода [3, 4]. Находка иско-

паемых костей налима в западносибирском местонахождении Чембакчино-94А (низовья р. Иртыш, возраст – 650000 ± 110000 TL (термолюминесцентный метод) [5] является одной из самых древних. Из этого следует, что Обь-Иртышский бассейн мог играть более важную роль в формировании разнообразия рода *Lota*, чем это следует из простой экстраполяции молекулярно-генетических данных, полученных для Европы и Восточной Сибири, на территорию Урала и Западной Сибири.

Цель работы – на примере географически удаленных выборок оценить генетическое разнообразие налима из Обь-Иртышского бассейна и его соответствие известнымкладам гаплотипов.

Анализ генетического разнообразия проведен на основании данных о последовательностях фрагмента контрольного региона митохондриальной ДНК 44 экземпляров налима: 20 особей – р. Иртыш в окрестностях г. Тобольск (58°37' с.ш., 68°31' в.д.) и 24 особи – р. Сось (66°39' с.ш., 65°33' в.д.), левобережный приток р. Обь (далее в тексте соответственно Тобольск и Сось).

ДНК выделяли методом водно-солевой экстракции с последующим осаждением этанолом [6] из образцов мышечной ткани, зафиксированных ранее в 96%-м этаноле. Амплификацию проводили с использованием праймеров LProF [7] и 12S5R [8] в 30 мкл реакционной смеси, содержащей от 10 до 100 нг ДНК, однократный буфер ПЦР, 1.25 мМ MgCl₂, 50 мкМ dNTP, 0.5 мкМ каждого праймера и 0.5 единицы Taq ДНК-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия), по следующему протоколу: предварительная денатурация (1 мин, 95°C), 36 циклов синтеза продукта ПЦР (95°C – 10 с, 58°C – 20 с, 72°C – 50 с), заключительная

Институт экологии растений и животных
Уральского отделения Российской Академии наук,
Екатеринбург
E-mail: juliakhrunyk@yahoo.co.uk; bor@ipae.uran.ru

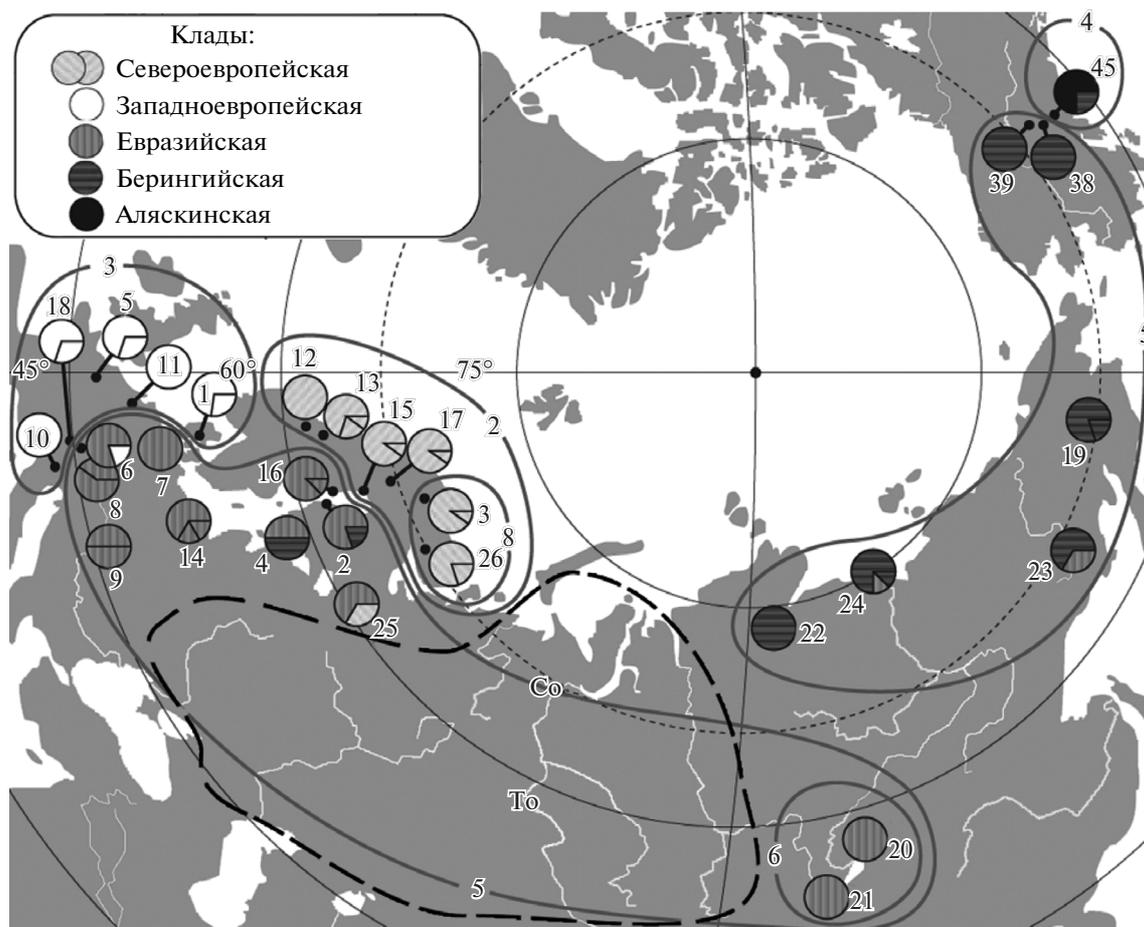


Рис. 1. Генетическое разнообразие и филогения *L. l. lota* и места сбора образцов в нашем исследовании. Секторные диаграммы отражают географическое распространение разных митохондриальных клад. Номера секторных диаграмм – локалитеты отбора проб [1], контуры филогрупп очерчены серыми линиями, цифры – генетические расстояния [1]. Пунктирная линия – молекулярно-генетические данные отсутствуют. Места сбора образцов в Западной Сибири: Со – р. Сось, То – Иртыш, г. Тобольск.

элонгация – 10 мин, 72°C. Очистку продукта ПЦР проводили по методике Великова [9].

Секвенирование осуществляли с помощью набора BigDye v.3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction при стандартных условиях с праймерами, использованными ранее в ПЦР. После очистки продукты реакции анализировали на автоматическом секвенаторе ABI3130 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США). Прямая и обратная последовательности отредактированы с помощью программы BioEdit [10]. Построение медианных сетей выполняли методом медианного связывания (Median Joining, MJ) с использованием программы Network 4.6.1.2 [11].

Поскольку 90% полиморфизма анализируемого фрагмента наблюдается в его первой гипервариабельной области [12], и большинство гаплотипов контрольного региона налима, представленных в базе данных NCBI (GenBank),

секвенированы не полностью, для сравнительного анализа использовали участок длиной 407 п.н. (всего 86 последовательностей, включая образцы из Тобольска и Соби).

Построение медианной сети гаплотипов мтДНК, объединяющей известные ранее гаплотипы двух линий налима – *L. l. lota* и *L. l. maculosa* – и впервые обнаруженные в популяциях Обь-Иртышского бассейна, подтвердило высокий уровень дифференциации *L. l. maculosa* от номинального подвида, что позволило его исключить из дальнейшего анализа. В отдельный кластер выделили гаплотипы, характерные для особей из р. Амур. Расстояния между кластерами составили 4 нуклеотидные замены. Кластер, объединяющий все остальные евроазиатские популяции, имеет звездчатую структуру, в центре которой расположены самые распространенные гаплотипы, и вокруг группируются несколько гаплогрупп (рис. 2).

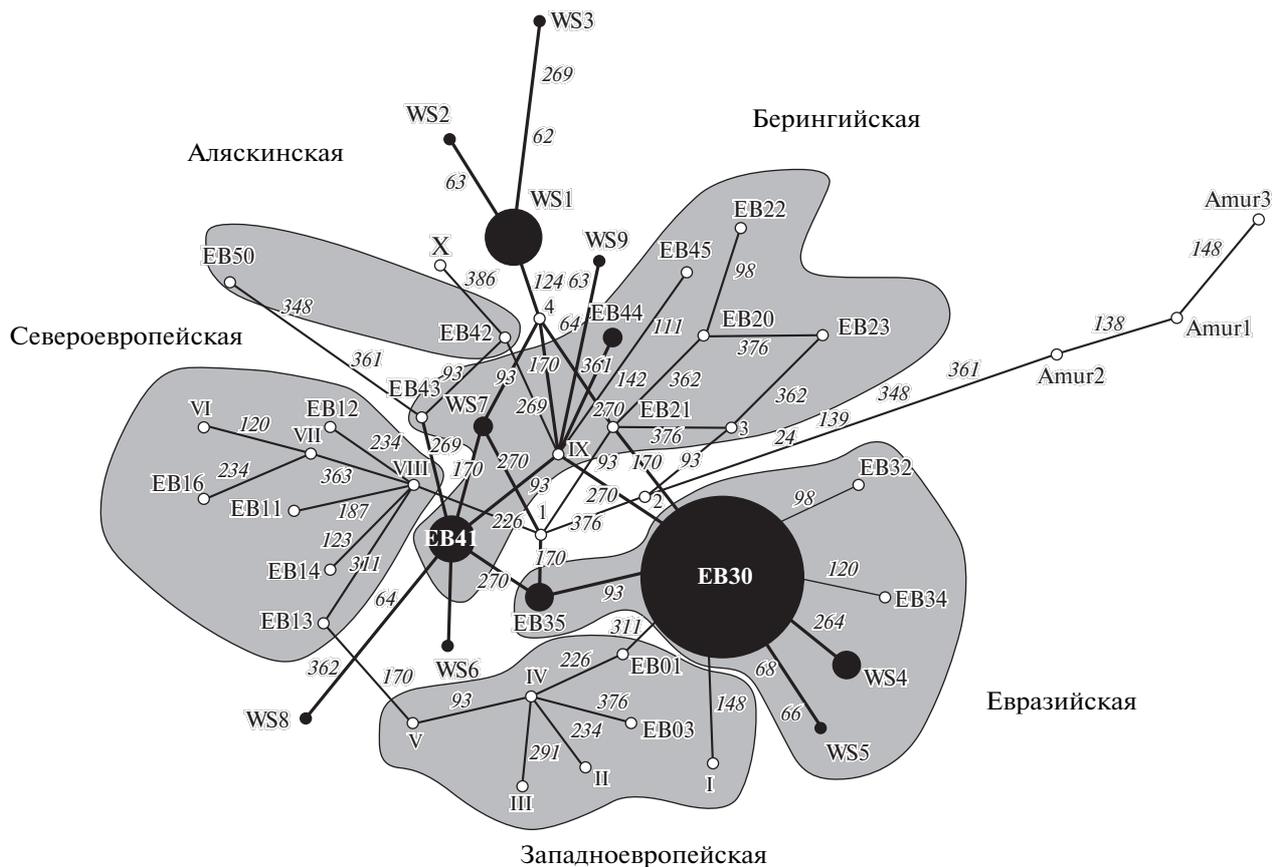


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов мтДНК налима *L. l. lota*, построенная на основе анализа участка контрольного региона (алгоритм – median joining, Network 4.6.1.2.). Гаплотипы, выявленные на территории Обь-Иртышского бассейна, обозначены чёрным цветом. Размер узлов пропорционален частоте встречаемости гаплотипов. Гаплотипы GenBank выделены белым цветом: Amur 1–3, I–X, EB 01–50; впервые обнаруженные гаплотипы – WS1–WS9; 1–4 – гипотетические гаплотипы. Фрагменты серого цвета – предполагаемые филогруппы [1]. Цифрами на векторах обозначены мутационные события.

Большинство секвенированных нами последовательностей контрольного региона (28 из 44) мтДНК налима Западной Сибири представлены гаплотипами, описанными ранее (табл. 1) и относящимися к евразийской и берингийской гаплогруппам. Большая часть образцов имеет гаплотип EB30, являющийся одним из центральных гаплотипов Евразии, распространение которого охватывает не только европейские (Изар, Висла), но и азиатские (Лена) реки, а также озеро Байкал [12]. Доля данного гаплотипа составляет 39%. Кроме того, у пяти особей из Тобольска и Соби нами обнаружен доминирующий берингийский гаплотип EB41, который встречается в Финляндии в р. Кюренйоки и в заливе Порккала. Этот гаплотип, обозначаемый также как Xj1, в большом количестве обнаружен в р. Иртыш на территории Северо-Западного Китая [13]. Другой берингийский гаплотип EB44 (Xj2) [13], также выявленный на этой территории, обнаружен в Соби.

В Обь-Иртышском бассейне мы обнаружили 9 новых гаплотипов, обозначенных WS 1–9 (Western Siberian, Западносибирские, табл. 1). Один из этих гаплотипов был общим для Соби и Тобольска. Остальные 9 гаплотипов были уникальны и встречались либо в р. Сось, либо в р. Иртыш. Можно предположить, что производные от WS1 гаплотипы WS2 и WS3 более поздние (рис. 2). Все три новых гаплотипа образуют отдельную гаплогруппу. Гаплотипы WS7, WS6 и WS8 близки к берингийскому гаплотипу EB41, в то время как евразийский гаплотип EB30 близок к гаплотипам WS4 и WS5.

Таким образом, выявлен высокий уровень генетического разнообразия анализируемого фрагмента контрольного региона мтДНК налима как в изученном участке р. Иртыш (центр Западно-Сибирской равнины), так и в нижнем течении р. Обь (приполярная часть Западно-Сибирской равнины). Наряду с преобладающими гаплотипами европейской и берингийской клад, 36% изученных

Таблица 1. Выявленные гаплотипы контрольного региона митохондриальной ДНК и число их носителей (*N*) в исследуемых популяциях налима Западной Сибири

Гаплотип	<i>N</i>	
	Тобольск	Собь
EB30	5	12
EB35	1	2
EB41	4	1
EB43	1	—
EB44	—	2
WS1	4	2
WS2	1	—
WS3	1	—
WS4	2	—
WS5	—	1
WS6	—	1
WS7	—	2
WS8	1	—
WS9	—	1

EB — ранее описанные гаплотипы [12, 13], WS — выявленные нами гаплотипы.

последовательностей приходится на 9 новых гаплотипов, три из которых формируют отдельную гаплогруппу. Все это указывает на то, что картина филогеографии номинативного подвида *L. l. lota* без учета молекулярно-генетических данных из популяций налима центральной части Евразии, в частности Западной Сибири, является не полной и требует пересмотра.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14–04–00614 и программы Президиума РАН № 12–М–45–2062.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Houdt J.K.J., De Cleyn L., Perretti A., Volckaert F.A.M. // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 2445–2457.
2. Elmer K.R., Van Houdt J.K.J., Meyer A., Volckaert F.A.M. // *Canad. J. Fisheries and Aquat. Sci.* 2008. V. 65. № 11. P. 2412–2426.
3. Borodin A.V., Strukova T.V., Trofimova S.S., Zinoviev E.V. The World of Elephants. In: *Proc. I Intern. Congr. Roma, 2001.* P. 267–271.
4. Borodin A.V., Markova E.A., Zinovyev E.V., Strukova T.V., Fominykh M.A., Zikov S.V. // *Quatern. Intern.* 2013. V. 284. P. 132–150.
5. Borodin A., Kosintsev P., Zinoviev E., Trofimova S., Nekrasov A. // *Meded. Nederlands Inst. Toegepaste Geowetenschappen.* 1998. № 60. P. 353–374.
6. Aljanabi S.M., Martinez I. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
7. Meyer A., Morrissey M., Schartl M. // *Nature.* 1994. V. 368. P. 539–542.
8. Elmer K.R., Recknagel H., Thompson A., Meyer A. // *Hydrobiologia.* 2012. V. 683. № 1. P. 217–229.
9. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство. Саратов: Саратов. источник, 2013. 84 с.
10. Hall T.A. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1999. V. 41. P. 95–98.
11. Bandelt H.-J., Forster P., Rohlf A. // *Mol. Biol. and Evolut.* 1999. V. 16. P. 37–48.
12. Van Houdt J.K.J., Hellemans B., Volckaert F.A.M. // *Mol. Phylogenet. and Evolut.* 2003. V. 29. P. 599–612.
13. Fang H., Zhang J., Song N., Qian L., Gao T. // *Rus. J. Genet.* 2013. V. 49. № 10. P. 1047–1056.