

ВТОРИЧНЫЙ КОНТАКТ МЕЖДУ ДВУМЯ ДИВЕРГЕНТНЫМИ ЛИНИЯМИ ГОЛЬЦОВ РОДА *Salvelinus* В СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ ПАЦИФИКЕ

© 2017 г. А. Г. Олейник^{1, *}, Л. А. Скурихина¹, А. Д. Кухлевский^{1, 2}

¹Национальный научный центр морской биологии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Владивосток 690041

²Дальневосточный федеральный университет, кафедра клеточной биологии и генетики, Владивосток 690600

*e-mail: alla_oleinik@mail.ru

Поступила в редакцию 21.03.2017 г.

Документирована современная контактная зона между берингийской и арктической филогенетическими линиями гольцов рода *Salvelinus* в Северо-Западной Пацифике. Сравнительный анализ показателей генетической дифференциации и дивергенции для аллопатричных и симпатричных популяций гольцов, филогенетический и генеалогический анализы гаплотипов мтДНК свидетельствуют, что в озерах Аччен и Пекульнейское вторично контактируют *S. m. malma* и *S. taranetzi*, в оз. Начикинском — *S. m. malma* и *Salvelinus* sp. 4, в оз. Дальнем — *S. m. malma* и *S. krogiausae*. Уровень дивергенции между филогенетическими группами гаплотипов значительно превышает диапазон внутривидовой изменчивости *S. m. malma* и не мог быть достигнут после колонизации озер в условиях симпатрии. Согласно полученным данным, территория Камчатки заселялась общим предком арктической филогруппы гольца Таранца.

Ключевые слова: северная мальма, голец Таранца, митохондриальная ДНК, генеалогия, симпатрия.

DOI: 10.7868/S001667581711008X

Юрий Петрович Алтухов более 25 лет посвятил изучению генетических процессов в природных популяциях тихоокеанских и атлантических лососей [1, 2]. Исторически сложилось так, что именно тихоокеанские лососи, в основном нерка, размножающиеся в озерах Камчатки, привлекли пристальное внимание исследователя и позволили сформулировать концепцию стабильного существования популяций на основе представлений о внутривидовом и межвидовом генетическом разнообразии. В рамках популяционно-генетического анализа Ю.П. Алтухов концентрировался на изучении особенностей наблюдаемого распределения изменчивости и определении причин его формирования. Анализируя экспериментальные данные, Ю.П. Алтухов с соавт. сделали важный вывод, что пространственное распределение изменчивости “...в значительной мере отражает исторические процессы формирования современных популяций в постледниковый период” [2, стр. 176]. Эти представления прочно заняли свое место в современных филогеографических исследованиях, в том числе и лососевых рыб.

Большое значение Ю.П. Алтухов придавал проблеме сохранения генетического разнообразия [1]. В этой связи особенно интересны уникальные озера северо-востока России, представ-

ляющие естественную лабораторию для изучения формирования биоразнообразия, механизмов дифференциации и эволюции гольцов рода *Salvelinus*. Научный интерес к ним связан с устойчивым существованием в ряде озер (в том числе Начикинском, Дальнем, Аччен и Пекульнейском) близкородственных таксонов в условиях симпатрии [3–7]. В то же время имеющихся генетических данных недостаточно, чтобы обсуждать причины возникновения разнообразия гольцов в современных озерных биосистемах и корректно анализировать демографические исторические процессы [8–13]. Ранее мы подтвердили генетическую дифференциацию *S. taranetzi* и *S. m. malma*, а также *Salvelinus* sp. 4 из оз. Начикинского и *S. m. malma* [14, 15]. Однако в этих работах было уделено ограниченное внимание количественной оценке уровня генетических различий симпатричных популяций. В связи с исследованием филогеографии *S. m. malma* на большей части ареала [16] появилась возможность получить уточненные данные о дифференциации *S. taranetzi* и *Salvelinus* sp. 4 с аллопатричными популяциями *S. m. malma*. Также очевидна необходимость проведения генеалогического анализа гаплотипов мтДНК, предоставляющего дополнительные возможности для срав-

Таблица 1. Данные об исследованных таксонах гольцов рода *Salvelinus*

Таксон	Локальность (обозначение)	Координаты	N ₁ /N ₂
<i>S. taranetzi</i>	оз. Аччен, п-ов Чукотка (TRAC)	64°50' N/174°36' W	15/16
<i>S. taranetzi</i>	оз. Пекульнейское, п-ов Чукотка (TRMP)	62°33' N/177°17' E	12/9
<i>Salvelinus</i> sp. 4	оз. Начикинское, п-ов Камчатка (SPNA)	53°01' N/157°50' E	17/4
<i>S. krogiusae</i>	оз. Дальнее, п-ов Камчатка (KGDA)	52°55' N/158°20' E	4/1
<i>S. m. malma</i>	р. Паратунка, п-ов Камчатка (MNPA)	52°58' N/158°15' E	25/2
<i>S. m. malma</i>	р. Камчатка, п-ов Камчатка (MNKA)	56°13' N / 162°01' E	25/2
<i>S. m. malma</i>	оз. Аччен, п-ов Чукотка (MNAC)	64°50' N/174°36' W	8/2
<i>S. m. malma</i>	оз. Пекульнейское, п-ов Чукотка (MNMP)	62°33' N/177°17' E	6/1
<i>S. m. malma</i>	руч. Гришкин (бассейн оз. Начикинского) (MNNA)	53°01' N/157°50' E	20/1
<i>S. m. malma</i>	р. Фрости-Крик (Frosty Creek), Аляска (DFRO)	55°10' N/162°48' W	10/2
<i>S. m. malma</i>	р. Конгакут (Kongakut R.), Аляска (DKON)	69°46' N/141°42' W	10/2
<i>S. a. oquassa</i>	Пруд Фладс (Floods Pond), Северная Америка (ARCTFLO)	44°73' N/68°49' W	—/2
<i>S. a. alpinus</i>	р. Тессема, п-ов Таймыр (ARGA)	69°49' N/90°64' E	—/1
<i>S. a. alpinus</i>	оз. Ситасьяуре (Sitasjaure Lake), Скандинавский п-ов, Швеция (ARLS)	67°53' N/17°37' E	—/6
<i>S. leucomaenis</i>	зал. Измены, о-в Кунашир (LEIZ)	52°21' N/142°25' E	—/2

Примечание. Объем выборки: N₁—PCR-RFLP анализ участков *ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*; N₂ — анализ нуклеотидных последовательностей генов *COI*, *Cytb* и участка *CR*.

нительного анализа формирования структуры генетического разнообразия в условиях симпатрии.

Цель работы состояла в том, чтобы описать структуру генетического разнообразия симпатричных гольцов в озерных экосистемах Камчатки и Чукотки, уточнить границы арктической филогенетической группы гольцов рода *Salvelinus* в Северо-Восточной Пацифике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа основана на оригинальном материале из коллекции авторов. В анализ включены как опубликованные [14, 15], так и новые результаты. Данные о географической локализации исследованных популяций, распределении по ареалу и объеме выборок приведены в табл. 1. Изменчивость мтДНК анализировали, используя полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (RFLP) трех участков (*ND1/ND2*, *ND5/ND6*, *Cytb/D-loop*), амплифицированных в полимеразной цепной реакции (PCR). Подробно общая схема лабораторного протокола PCR-RFLP анализа мтДНК изложена ранее [14, 15]. Все образцы, включенные в анализ, были повторно проанализированы при картировании участков мтДНК. Обозначение гаплотипов *S. m. malma* соответствует работе [16]. Для более точного филогенетического анализа мы определили нуклеотидные последовательности контролирующего региона (*CR*), генов цитохрома *b* (*Cytb*) и цитохромоксидазы-1 (*CoI*). Фрагменты мтДНК амплифицировали, очищали, секвенировали в рекомендо-

ванных производителем условиях, с использованием набора BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, США). Последовательности нуклеотидов определяли в автоматическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Выравнивание последовательностей проводили с использованием программы SeqScape v. 2.5 (Applied Biosystems, США). Для амплификации и секвенирования использовали наборы праймеров, которые ранее применялись для лососевых рыб [17, 18]. Нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных Genbank/NCBI под номерами доступа KY1222042–KY122332.

Степень генетической дифференциации между парами популяций определяли на основе критерия Φ_{ST} [19, 20] методом одноуровневой и многоуровневой AMOVA [21], используя пакет программ Arlequin vers. 3.5 [22]. Существенность иерархических компонентов дисперсии и соответствующих Φ -статистик оценивали из непараметрического распределения псевдовероятностного теста [21]. Оценки дивергенции [23, 24] между симпатричными и аллопатричными популяциями гольцов, включая дополнительные выборки *S. m. malma* по ареалу [16], рассчитывали в пакете REAP [25]. Исторические демографические процессы тестировали по распределению нуклеотидных замен между всеми парами гаплотипов (*mismatch* — распределение) [26, 27] в Arlequin vers. 3.5. Учитывая небольшое число гольцов, у которых были секвенированы нуклеотидные последовательности мтДНК, расчеты дифферен-

циации выполнены только по данным PCR-RFLP анализа.

Для представления филогенетических отношений между гаплотипами использовали метод медианных сетей (алгоритм MJ) [28], реализованный в пакете программ Network 4.5.02 (Fluxus Technology Ltd., www.fluxus-engineering.com). Дополнительно были построены дендрограммы — NJ на основе LogDet дистанций [29] и ML (TN93 + G + I модель нуклеотидных замещений [30]), с тестированием топологии с помощью бутстрэп-анализа (1000 реплик) [31]. Статистический и филогенетический анализы проводили в программе MEGA7 [32]. В качестве внешней группы использовали *S. leucomaenis*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основе PCR-RFLP анализа трех участков мтДНК (*ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*) в суммарной выборке выявлено 32 гаплотипа. Общее число сайтов, определенных из анализа размеров и распределения рестрикционных фрагментов в гаплотипах, равно 364 и составляет около 1460 нуклеотидов (9.0% митохондриального генома). По объединенной секвенированной последовательности (1–1021 пара нуклеотидов (пн) *CR*, 1022–2221 пн *CoI* и 2222–3362 пн *Cytb*) без учета внешней группы выявлено 109 вариабельных сайтов (84 информативных) и 27 разных гаплотипов.

Распределение гаплотипов мтДНК гольцов из озер Аччен, Пекульнейское и Начикинское показано на рис. 1 в соответствии с абсолютными частотами в выборках. Гаплотипический состав двух аллопатричных популяций *S. taranetzi* представлен 11 гаплотипами (TR1–TR11), не принадлежащими к филогенетической группе *S. m. malma*. Среди особенностей распределения гаплотипов в анализируемых выборках *S. taranetzi* можно отметить наличие общего доминирующего гаплотипа (TR2), уникальных гаплотипов, характерных только для каждой озерной популяции, и минимальный уровень нуклеотидных различий между гаплотипами. По данным PCR-RFLP анализа четыре гольца *S. krogiaesae* и один голец Таранца из оз. Пекульнейского имеют общий гаплотип (TR9). Однако секвенирование гена *Cytb* и *CR* показало, что гаплотипы отличаются на одну нуклеотидную замену (KY122271/KY122174 и KY122326/KY122229). По уточненным данным гаплотипический состав выборки *Salvelinus* sp. 4 из оз. Начикинского представлен пятью уникальными гаплотипами и не имеет общих гаплотипов не только с симпатричной *S. m. malma*, но и с выборками из аллопатричных популяций *S. m. malma*, *S. taranetzi*, *S. krogiaesae* (рис. 1).

Распределения попарных различий между гаплотипами мтДНК [26], выявленных в озерах Аччен, Пекульнейское, Начикинское и Дальнее, статистически существенно отклоняются от униmodalного распределения (рис. 2). Присутствие двух пиков, разделенных значительными разрывами, указывает на высокую генетическую гетерогенность географических выборок. В то же время *mismatch*-распределение для таксономических групп *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4 и *S. krogiaesae* (не показано на рисунке) близко к униmodalному (рис. 3). Наличие основных пиков в области минимальных различий между сайтами, включая 0 (сравнение особей с идентичными гаплотипами), свидетельствует об историческом уменьшении эффективной численности предковых популяций и/или эффекте основателя.

Сети гаплотипов (MJ-анализ) объединенных участков *ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6* мтДНК у гольцов, симпатрично обитающих в озерах Аччен, Пекульнейское (рис. 4,а) и Начикинское (рис. 4,б), имеют два центра радиации, генеалогическое расстояние между которыми равно 25 нуклеотидным заменам. Одна из этих групп объединяет гаплотипы *S. m. malma*. В структуре генеалогии *S. taranetzi* внутреннее положение занимает гаплотип TR2 (рис. 4,а), доминирующий в обеих озерных популяциях. Особенности данной генеалогии являются укороченная протяженность и наличие структурированности гаплотипической сети, обусловленной, вероятно, географической локализацией популяций в изолированных озерах. Практически все выявленные гаплотипы *S. taranetzi* связаны парсимониально. Особенностью генеалогии *Salvelinus* sp. 4 является радиальная структура кластера, внутреннее положение в котором занимает доминирующий гаплотип (SP2). Небольшая протяженность генеалогий *S. taranetzi* и *Salvelinus* sp. 4 определяется низким нуклеотидным разнообразием выборок [14, 15].

Для сравнения была построена генеалогия гаплотипов мтДНК *Salvelinus* sp. 4, *S. taranetzi*, *S. krogiaesae* (рис. 4,в). На данном дереве также присутствуют два центра радиации, представляющих филогенетические группы гаплотипов *Salvelinus* sp. 4 и *S. taranetzi*. Генеалогическое расстояние между филогенетическими группами *Salvelinus* sp. 4 и *S. taranetzi* равно восьми нуклеотидным заменам.

Оценка подразделенности полиморфизма мтДНК с помощью критерия Φ_{ST} подтвердила дифференциацию между выборками гольцов (табл. 2). Попарные оценки Φ_{ST} как для симпатричных, так и для аллопатричных с *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4 и *S. krogiaesae* популяций *S. m. malma* статистически значимы ($p < 0.01$) (табл. 2). Значения Φ_{ST} между симпатричными озерными *S. taranetzi* и *S. m. malma* (0.91147 и 0.86798), *Salvelinus* sp. 4 и *S. m. malma* (0.95348), *S. krogiaesae* и

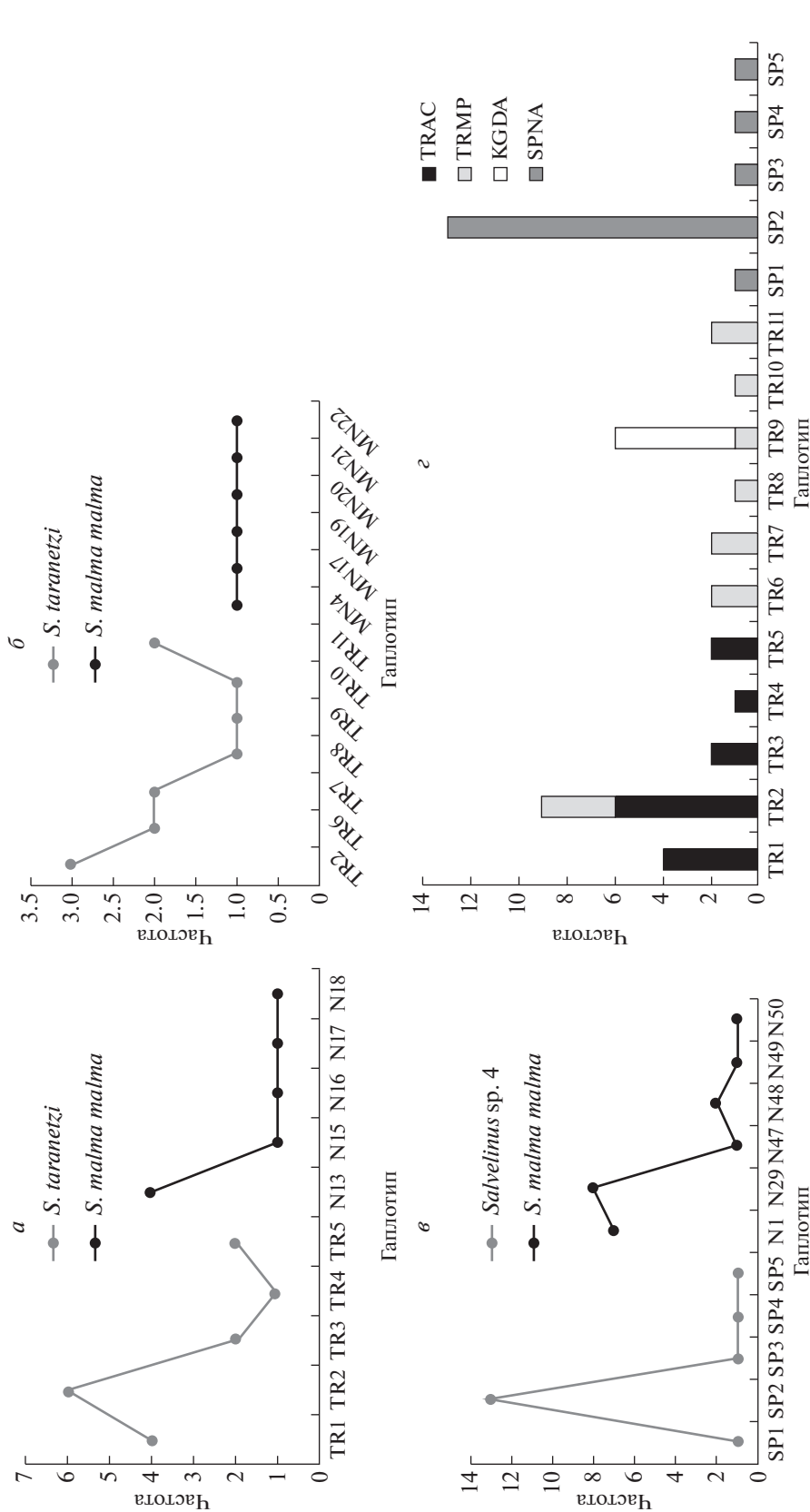


Рис. 1. Частоты гаплогенов мтДНК (участки ND1/ND2, ND5/ND6, Cytb/D-loop) гольцов рода *Salvelinus* в выборках из оз. Аччен (а), оз. Пекульнейское (б), бассейна оз. Начикинское (в). Распределение частот гаплогенов мтДНК в выборках *S. taranetzi*, *S. krogia* и *Salvelinus* sp. 4 (г).

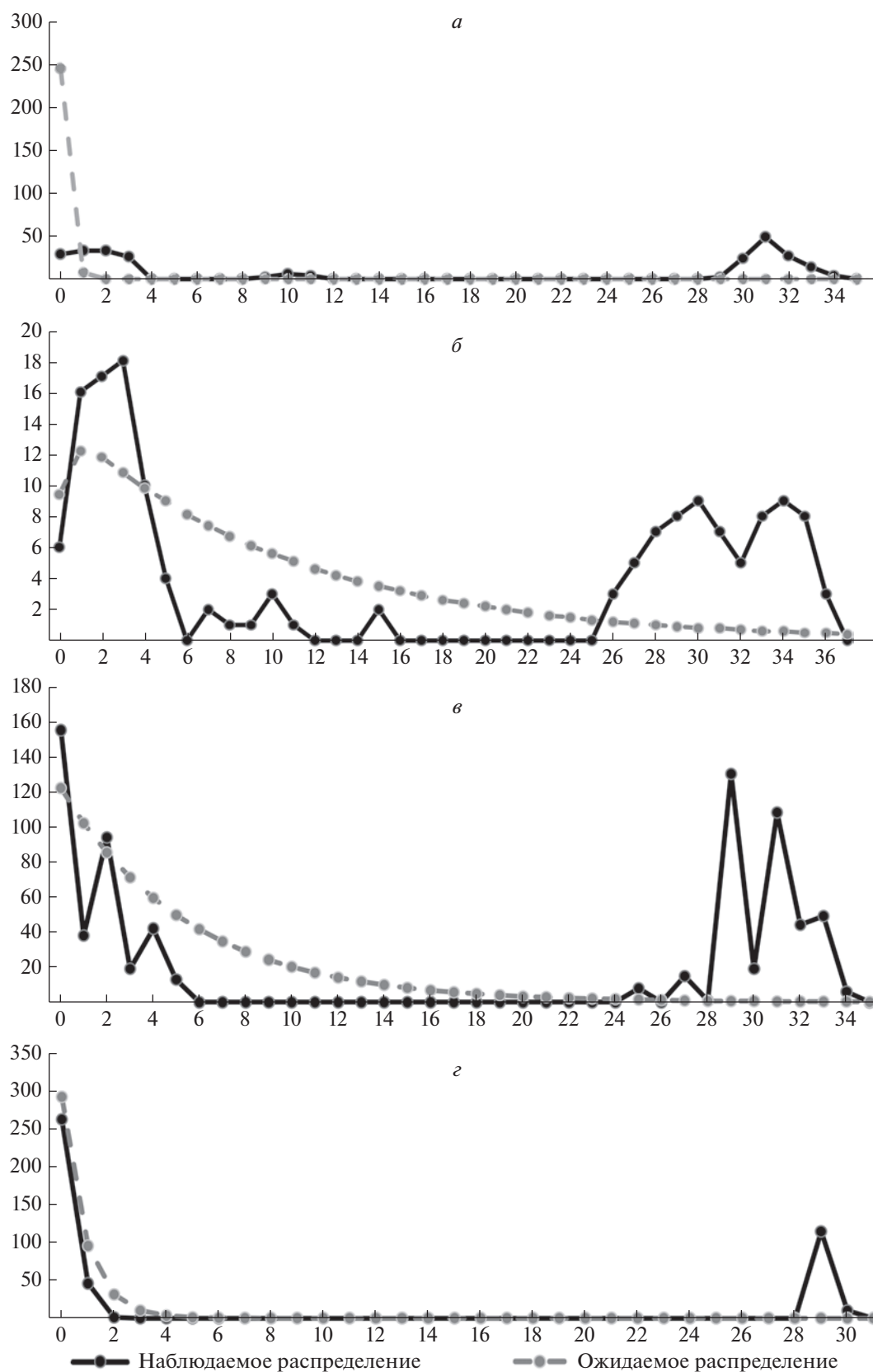


Рис. 2. Распределение числа нуклеотидных замен [21] между гаплотипами гольцов рода *Salvelinus* в выборках из оз. Аччен (а), оз. Пекульнейское (б), бассейна оз. Начикинского (в), бассейна оз. Дальнее (г). По оси абсцисс — число попарных различий.

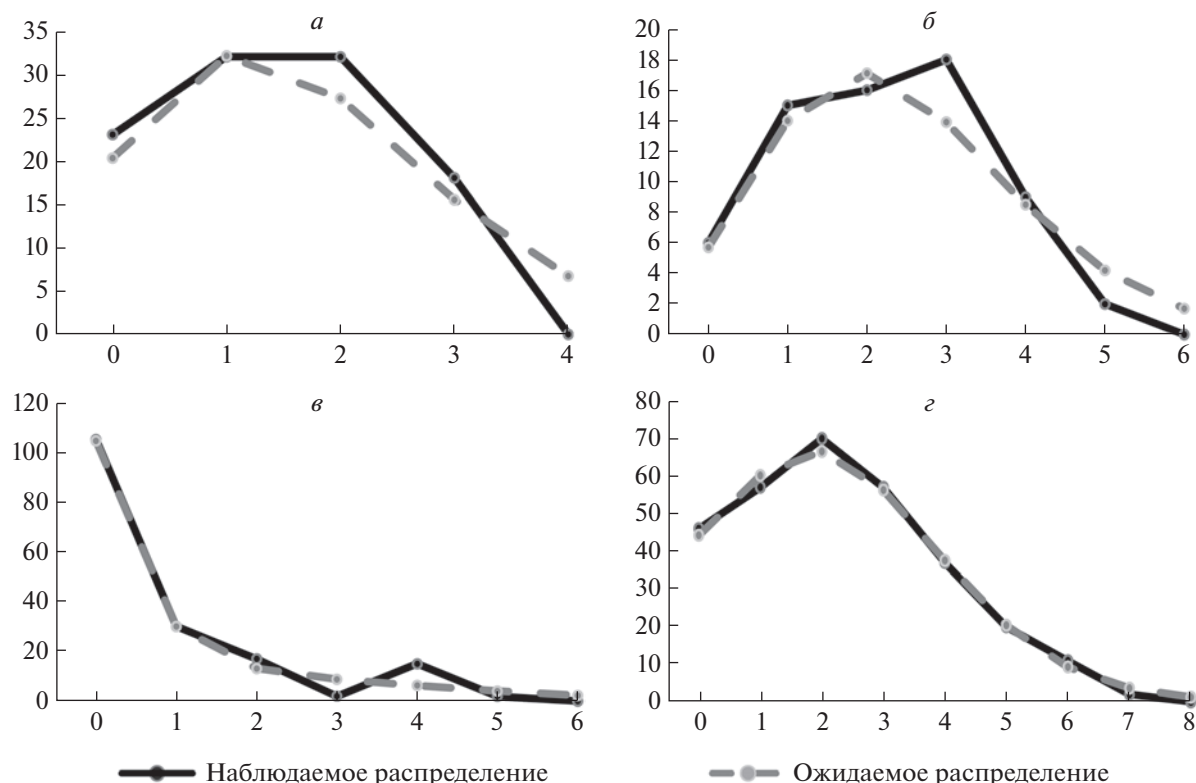


Рис. 3. Распределение числа нуклеотидных замен [21] между гаплотипами *S. taranetzi* в выборках из оз. Аччен (а) и оз. Пекульнейское (б), *Salvelinus* sp. 4 (в) и в объединенной выборке *S. taranetzi* (з). По оси абсцисс – число попарных различий.

S. m. malma (0.99529) превышают в среднем в 2 раза показатели для аллопатричных популяций *S. m. malma* (0.02136–0.47840) и аллопатричных популяций *S. taranetzi* (0.43354).

Попарные Φ_{ST} между аллопатричными *S. taranetzi* и *Salvelinus* sp. 4, *Salvelinus* sp. 4 и *S. krogiusae* имеют высокие значения и статистически значимы ($p < 0.001$) (табл. 2). В то же время не удалось обнаружить существенных различий *S. krogiusae* с выборками *S. taranetzi* ($p > 0.05$), что, вероятно,

связано с ошибкой выборочности. Существенные различия выявлены между объединенными выборками *S. m. malma* и *S. taranetzi* ($p < 0.001$). Таким образом, аллопатричные популяции *S. taranetzi* менее дифференцированы, чем симпатричные озерные популяции *S. m. malma* и *S. taranetzi*.

Согласно AMOVA [21], основная доля молекулярной дисперсии частот гаплотипов всех тестируемых выборок из симпатричных популяций приходится на различия между группами *S. taranetzi* и

Таблица 2. Тестирование уровня дифференциации симпатричных и аллопатричных популяций гольцов: критерий Φ_{ST} [19, 20]

Популяция	1	2	3	4	5	6	7
<i>Salvelinus</i> sp. 4 (оз. Начикинское)							
<i>S. taranetzi</i> (оз. Аччен)	0.89874***						
<i>S. taranetzi</i> (оз. Пекульнейское)	0.85793***	0.43354***					
<i>S. krogiusae</i> (оз. Дальнее)	0.92228***	0.80027	0.52854				
<i>S. m. malma</i> (руч. Гришкин)	0.95348***	0.93947***	0.92515***	0.94380***			
<i>S. m. malma</i> (оз. Аччен)	0.93526***	0.91147***	0.88539***	0.89295***	0.20776**		
<i>S. m. malma</i> (оз. Пекульнейское)	0.92616***	0.89925***	0.86798***	0.86281**	0.21319**	0.02136	
<i>S. m. malma</i> (р. Паратунка)	0.98565***	0.97846***	0.97090***	0.99529***	0.24918***	0.41511***	0.47840***

Примечание. Уровни значимости различий между популяциями: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

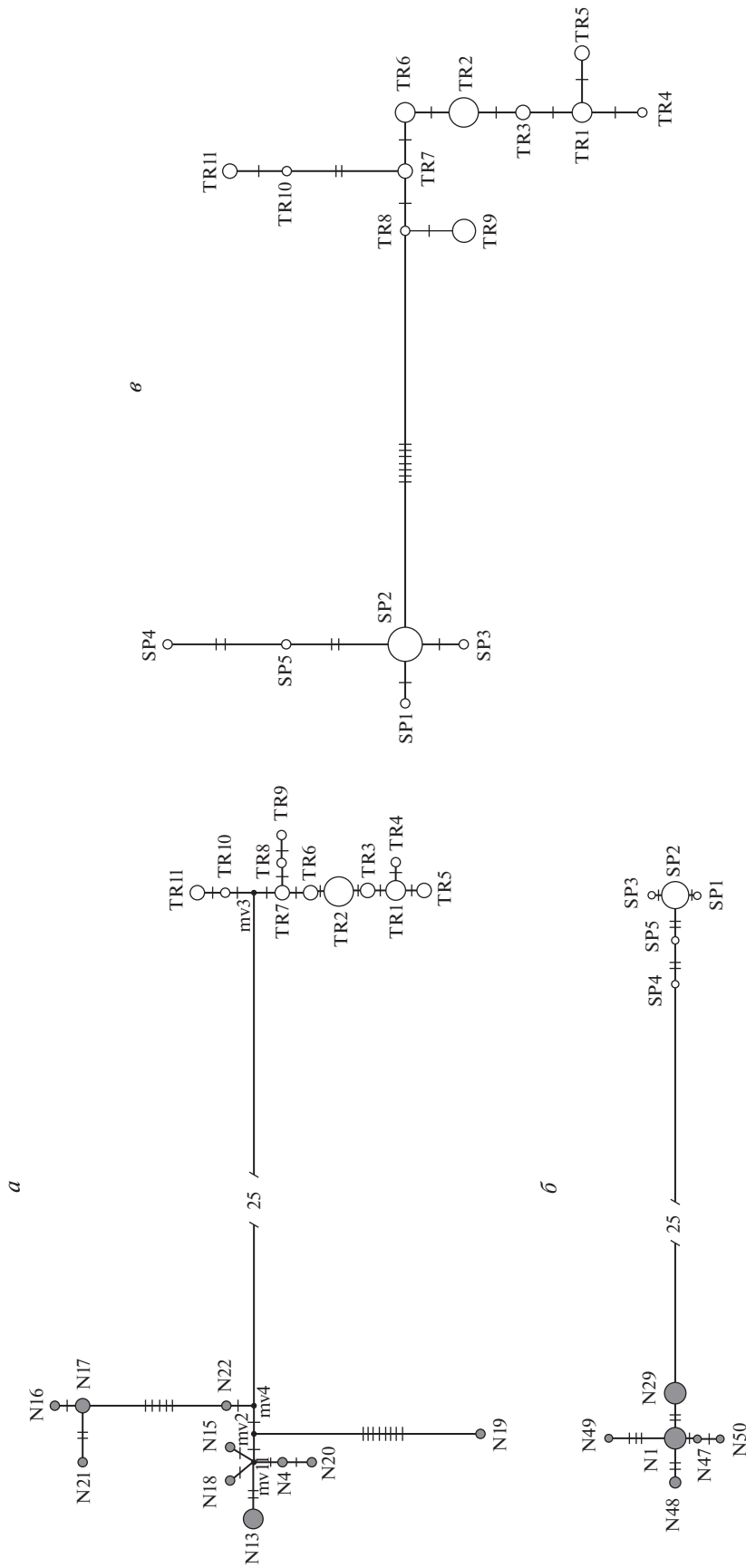


Рис. 4. Генеалогическая сеть (MJ-анализ) гаплотипов мтДНК (участки *ND1/ND2*, *ND5/ND6*, *Cytb/D-loop*) голецов рода *Salvelinus*: *а* – *S. taranetzi* и *S. m. malma* из оз. Аччен и оз. Пекульнейское; *б* – *Salvelinus* sp. 4 и *S. m. malma* из бассейна оз. Начикинское; *в* – *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae*. На ветвях штрихами указано число нуклеотидных замен; размер окружностей пропорционален абсолютным частотам гаплотипов. Все мутации имеют равный вес, интервал поиска медианных векторов (черные окружности) ϵ равен нулю. Серым цветом выделены гаплотипы *S. m. malma*.

Таблица 3. Иерархический анализ межпопуляционных гаплотипических различий гольцов рода *Salvelinus* [21]

Уровень разнообразия	<i>d.f.</i>	Дисперсия, %	Вероятность (<i>p</i>)
Вариант I (популяции озер Аччен и Пекульнейское)			
между популяциями (<i>S. taranetzi</i> и <i>S. m. malma</i>)	1	87.56	0.00000
внутри популяций	39	12.44	
Вариант II (популяции <i>S. taranetzi</i>)			
между популяциями <i>S. taranetzi</i>	1	43.35	0.00000
внутри популяций	25	56.65	
Вариант III (оз. Начикинское)			
между популяциями (<i>Salvelinus</i> sp. 4 и <i>S. m. malma</i>)	1	93.10	0.00000
внутри популяций	76	6.90	
Вариант IV (<i>S. taranetzi</i> , <i>Salvelinus</i> sp. 4, <i>S. krogiusae</i> и <i>S. m. malma</i>)			
между группами	1	82.57	0.03018
между популяциями внутри групп	6	11.60	0.00000
внутри популяций	102	5.83	0.00000

S. m. malma (87.56%, $p < 0.001$), а также *Salvelinus* sp. 4 и *S. m. malma* (93.10%, $p < 0.001$), при слабом генетическом разнообразии внутри популяций (12.44 и 6.90% дисперсии, соответственно; $p < 0.001$) (варианты I, III; табл. 3). Анализ для объединенных выборок *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae* и *S. m. malma* (вариант IV; табл. 3) подтвердил обнаруженные закономерности распределения изменчивости. В то же время для *S. taranetzi* характерны высокие показатели генетического разнообразия как внутри (56.65%), так и между популяциями (43.35%) (вариант II; табл. 3). Поэтому распределение молекулярного разнообразия мтДНК между тестируемыми симпатричными и аллопатричными популяциями существенно отклоняется от обнаруженных закономерностей у *S. m. malma*, для которой на всем ареале характерно высокое генетическое разнообразие внутри популяций (75%) и умеренная структурированность между популяциями (25%) [16].

Оценки дивергенции между выборками *Salvelinus* sp. 4 и *S. m. malma* из бассейна оз. Начикинского, *S. taranetzi* и *S. m. malma* из озер Аччен и Пекульнейского, *S. krogiusae* и *S. m. malma* из бассейна оз. Дальнее равны (в среднем 2.1%) (табл. 4) и в десятки раз превосходят уровень внутривидовой изменчивости *S. m. malma*. Согласно нашим данным, средняя попарная дивергенция *S. m. malma* по ареалу варьирует от 0 до 0.23% [16]. В то же время дивергенция между аллопатричными популяциями *S. taranetzi* (0.001%) не превышает диапазон межпопуляционной дивергенции видов гольцов, ареалы которых расположены в бассейнах Арктики и Северной Пацифики [12, 33]. Попарные оценки дивергенции *Salvelinus* sp. 4, *S. taranetzi*, *S. krogiusae* достоверно выше, но не превышают 0.7% (0.55–0.67%).

Соотношение оценок дивергенции по данным анализа объединенных нуклеотидных последовательностей генов *COI*, *Cytb* и *CR* участка мтДНК во многом аналогично отмеченным выше закономерностям. Уровень дивергенции для аллопатричных и симпатричных популяций *S. taranetzi* и *S. malma malma*, *Salvelinus* sp. 4 и *S. malma malma*, *S. krogiusae* и *S. malma malma*, а также всех озерных гольцов от *S. alpinus*, в среднем равен 1.4%. Дивергенция между аллопатричными *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae* находится в диапазоне от 0.001 ± 0.000 до 0.003 ± 0.001 . Эти значения несколько ниже, чем полученные на основе PCR-RFLP анализа мтДНК, но соответствуют внутривидовой изменчивости гольцов рода *Salvelinus* [34].

Таким образом, получены доказательства, что различные популяции гольцов, симпатрично обитающие в исследованных озерных экосистемах, дифференцированы не только на морфологическом и экологическом уровнях [3–5, 7], но и генетически. Вопрос, на который следует ответить, заключается в следующем: имеется ли в современных симпатричных популяциях поток генов. Опосредованным маркером потока генов может быть соотношение общих гаплотипов в симпатричных и аллопатричных популяциях [35]. Если имеет место поток генов, то предполагается, что часть общих гаплотипов будет выше в симпатричных популяциях, чем в аллопатричных, и, как следствие, генетические дистанции между симпатричными популяциями будут меньше. Анализ распределения оценок дивергенции (табл. 4) между выборками показывает, что генетически более близкие аллопатричные *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae* в равной степени дивергировали как от симпатричных, так и от географически удаленных аллопатричных популяций *S. m. malma*.

Таблица 4. Степень дивергенции мтДНК [23, 24] между популяциями гольцов рода *Salvelinus*

Таксон/Популяция	<i>S. taranetzi</i> (Аччен)	<i>S. taranetzi</i> (Пекульнейское)	<i>Salvelinus</i> sp. 4 (Начикинское)	<i>S. krogiusae</i> (Дальнее)
<i>S. taranetzi</i> (Аччен)		0.00093	0.00666	0.00312
<i>S. taranetzi</i> (Пекульнейское)	0.00093		0.005648	0.00134
<i>Salvelinus</i> sp. 4 (Начикинское)	0.00666	0.00564		0.00554
<i>S. krogiusae</i> (Дальнее)	0.00312	0.00134	0.00554	
<i>S. m. malma</i>				
оз. Аччен	0.02064	0.01948	0.02194	0.02096
оз. Пекульнейское	0.02056	0.01936	0.02159	0.02063
р. Анадырь	0.02069	0.01953	0.02186	0.02101
р. Апука	0.02075	0.01959	0.02191	0.02107
р. Камчатка	0.02090	0.01974	0.02176	0.02116
р. Кроноцкая	0.02075	0.01960	0.02202	0.02107
руч. Гришкин	0.01999	0.01883	0.02125	0.02030
р. Паратунка	0.02093	0.01978	0.02219	0.02125
р. Яма	0.02092	0.01977	0.02218	0.02124
руч. Холодный	0.02100	0.01984	0.02128	0.02132
р. Кухтуй	0.02091	0.01975	0.02203	0.02123
р. Конгакут (Kongakut R.)	0.02051	0.01935	0.02177	0.02083
р. Кивалина (Kivalina R.)	0.02079	0.01963	0.02205	0.02110
р. Келли (Kelly R.)	0.02059	0.01943	0.02184	0.02091
р. Кобльстоун (Cobblestone R.)	0.02100	0.01985	0.02227	0.02132
р. Синук (Sinuk R.)	0.02079	0.01964	0.02206	0.02111
р. Соломон (Solomon R.)	0.02080	0.01964	0.02207	0.02112
р. Канекток (Kanektok R.)	0.02043	0.01928	0.02169	0.02075
р. Кашаяк (Kashaiak R.)	0.02096	0.01980	0.02222	0.02128
оз. Бечаров (Becharof L.)	0.02095	0.01979	0.02222	0.02127
р. Фрости-Крик (Frosty Creek)	0.02210	0.02095	0.02338	0.02243
р. Рассел-Крик (Russel Creek)	0.02119	0.02003	0.02246	0.02151
бух. Оук-Бей (Auke Bay)	0.02231	0.02118	0.02361	0.02265

Скорее всего, в настоящее время между симпатричными озерными гольцами и *S. m. malma* поток генов отсутствует, и они репродуктивно изолированы.

Результаты кариологического [8] и генетико-биохимического [9–11] анализов *S. taranetzi* и *S. m. malma* соответствуют этому выводу. На основе сравнительного анализа объединенных аллозимных данных [36], изменчивости нуклеотидных последовательностей участков мтДНК [37, 38] был сделан вывод, что мальма и голец Таранца относятся к разным филогенетическим группам (берингийской и арктической), возникновение которых связано с изоляцией в отдельных ледниковых рефугиумах. Нет никаких оснований рассматривать столь сильно дивергировавшие филогенетические группы как сезонные расы, которые дифференцируются по морфологии и степени

развития брачного наряда [6]. Имеющиеся данные о генетической дифференциации сезонных рас [39], темпоральных группировок [40], а также смежных поколений [41] у лососевых рыб свидетельствуют, что показатели генетической дифференциации на данных уровнях популяционной структурированности имеют низкие значения и не превышают диапазона внутривидовой изменчивости.

Результаты филогенетического анализа объединенной последовательности генов *COI*, *Cytb* и участка *CR* мтДНК, представленные в виде топологии консенсусного дерева (рис. 5), не только показывают значительную дивергенцию между симпатричными гольцами, обитающими в озерах Аччен, Пекульнейское, Начикинское и Дальнее, но и предполагают их происхождение от разных предковых линий. Монофилетическая группа

(*S. taranetzi*, *S. krogiusae*, *Salvelinus* sp. 4) дивергировала от общего предка раньше разделения *S. m. malma* и *S. alpinus*. Поэтому ни один из гаплотипов мтДНК *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae* нельзя считать производным от гаплотипов симпатричной *S. m. malma* или аллопатричного *S. alpinus*. Не вызывает сомнения, что в озерах Аччен и Пекульнейское именно вторично контактируют *S. m. malma* и *S. taranetzi*, в оз. Начикинском — *S. m. malma* и *Salvelinus* sp. 4, в оз. Дальнем — *S. m. malma* и *S. krogiusae*. Каждая из этих пар не является монофилетической группой. Генеалогический анализ также свидетельствует о существовании значительно дивергировавших групп, каждая из которых коалесцирует к собственному предковому гаплотипу мтДНК (рис. 4). Полученные результаты коррелируют с результатами анализа мтДНК у представителей арктической группы [12, 13] и позволяют уточнить представления о дивергенции основных филогенетических линий внутри рода *Salvelinus* [37, 38, 42, 43].

Появление зон симпатрии в озерах Восточной Чукотки объясняют либо вторичным контактом ранее аллопатричных популяций [3–5], либо симпатрической дивергенцией на основе трофической и биотопической специализации от исходной формы гольцов, в качестве которой рассматривается проходная мальма [6, 7]. Анализ показателей генетической дифференциации, генеалогий и *mismatch*-распределений гаплотипов мтДНК подтверждает выводы М.К. Глубоковского и И.А. Черешнева [3, 5], основанные на данных морфологии и экологии. Наши данные доказывают общее происхождение географически удаленных популяций *S. taranetzi*. В то же время дивергенция между филогенетическими группами гаплотипов значительно превосходит диапазон внутривидовой изменчивости *S. m. malma* и не могла быть достигнута после колонизации озер в условиях симпатрии, с учетом общепринятых оценок эволюции последовательностей мтДНК лососевых рыб [44]. Следовательно, бимодальные зоны симпатрии в озерах Аччен, Пекульнейское, Начикинское и Дальнее возникли в результате вторичного контакта предков берингийской и арктической филогрупп, которые эволюционировали в изолированных рефугиумах, разделенных Берингийской сушей. Согласно И.А. Черешневу [45], возможность для колонизации водоемов Восточной Чукотки и Камчатки гольцами появилась в конце плейстоцена, после восстановления Берингова пролива. Все обсуждаемые выше зоны симпатрии гольцов рода *Salvelinus* показали соответствие направлений экологической, морфологической и генетической дифференциации.

На основе фенетической кластеризации гаплотипов мтДНК [14] была высказана гипотеза о существовании у *S. taranetzi* двух рефугиумов, из которых осуществлялась колонизация озер. Гене-

алогический анализ и *mismatch*-распределение гаплотипов мтДНК предполагают, что аллопатричные популяции *S. taranetzi* были основаны мигрантами из одной предковой популяции. Однако в каждом озере, помимо общего основного гаплотипа, встречаются уникальные гаплотипы мтДНК, возникшие в процессе самостоятельной эволюции в условиях географической изоляции. Поэтому отмеченная географическая структурированность при кластеризации гаплотипов мтДНК, наиболее вероятно, связана либо с фрагментацией после расширения ареала, либо с ограниченным потоком генов в условиях изоляции озерных популяций. В то же время в дополнительно проанализированной выборке из оз. Пекульнейское (2000 г.) был обнаружен голец Таранца (KY122326/KY122132/KY122229) близкий к *Salvelinus* sp. 4, что может свидетельствовать о множественных вселениях (по крайней мере двух) в это озеро. Не отрицая полностью возможности существования у *S. taranetzi* нескольких ледниковых рефугиумов, тем не менее следует отметить, что минимальное расстояние между гаплотипами *S. taranetzi* подтверждает, что основная реколонизация озер Аччен и Пекульнейское проходила из одного рефугиума.

Радиальная структура укороченных кластеров *S. taranetzi* и *Salvelinus* sp. 4, *mismatch*-распределение и низкое нуклеотидное разнообразие мтДНК указывают на историческое снижение эффективной численности озерных популяций. Снижение эффективной численности могло иметь место как в предковой популяции, так и при освоении новых территорий вследствие эффекта основателя [46]. Наконец, в некоторых современных популяциях могут действовать факторы, ограничивающие их эффективную численность. Последний аргумент представляется менее вероятным для *S. taranetzi*, так как в обеих озерных популяциях выявлен высокий уровень гаплотипического разнообразия мтДНК [14]. В пользу того, что снижение эффективной численности связано с предковой популяцией, косвенно свидетельствуют низкие значения средней гетерозиготности аллозимных локусов в популяциях *S. taranetzi* рек Сеутакан и Амгуэма [9]. Напротив, поскольку в Начикинском озере наблюдается статистически значимое снижение показателей гаплотипического и нуклеотидного разнообразия *Salvelinus* sp. 4 по сравнению с симпатричной *S. m. malma* [15], возможно, кроме исторических, существуют и некоторые современные факторы, ограничивающие численность гольцов.

Попытки обнаружить генетическую дифференциацию на основе анализа изменчивости мтДНК между симпатричными популяциями гольцов, обитающими в озерных экосистемах, во многих случаях не привели к положительным результатам [37, 42]. Был сделан вывод о том, что

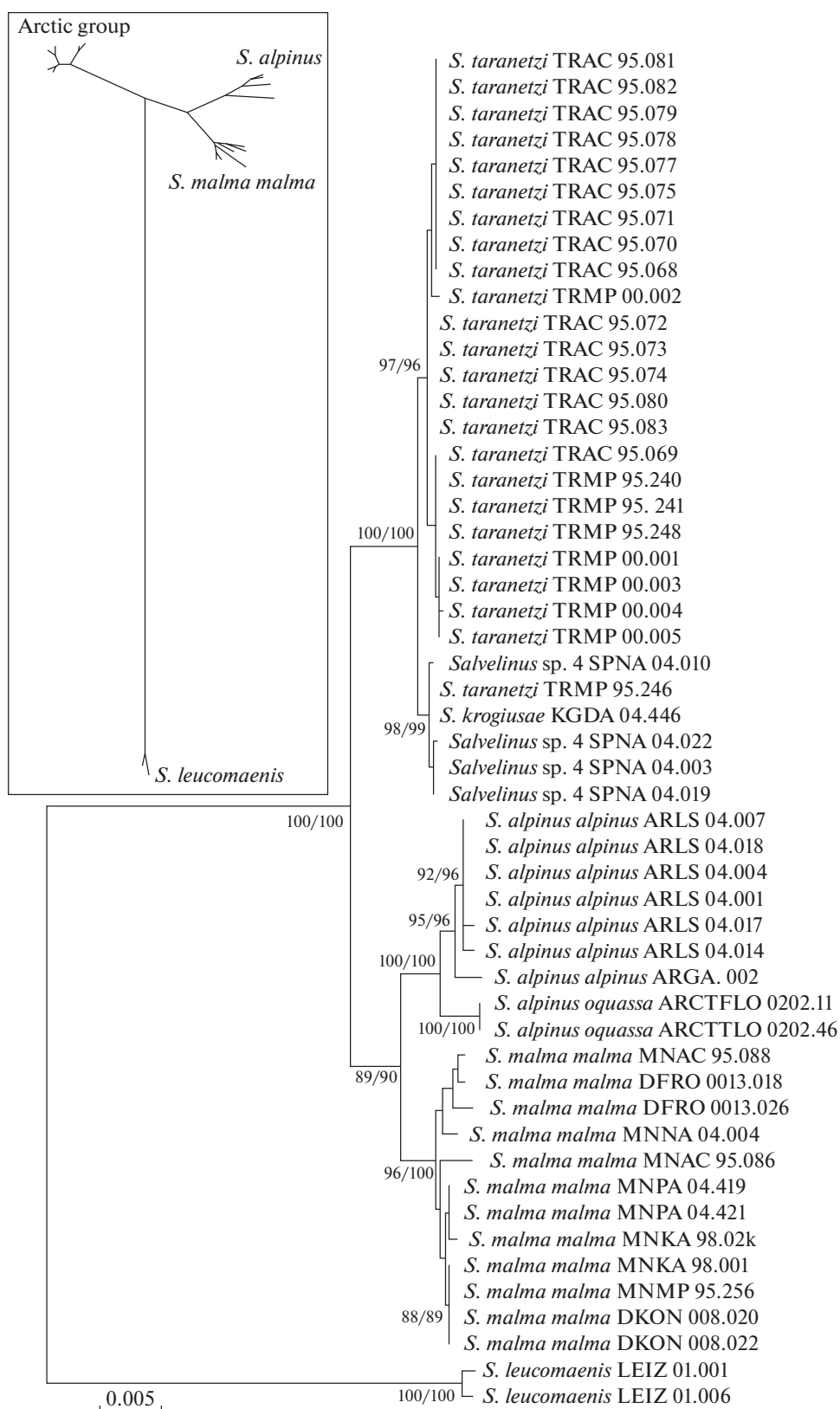


Рис. 5. Филогенетические отношения (ML-дерево) голец рода *Salvelinus* по данным анализа объединенных нуклеотидных последовательностей генов *COI*, *Cytb* и *CR*-участка мтДНК. Цифры в узлах соответствуют значениям бутстрэп-поддержки ($BS > 80\%$) для ML- и NJ-деревьев соответственно. Внешняя группа — *S. leucomaenis*. Во вставке показана топология бескорневого NJ-дерева. Обозначение особей приводится согласно обозначению локальности (см. табл. 1).

низкие разрешающие возможности связаны с общим невысоким уровнем разнообразия мтДНК гольцов, исторические ареалы которых находились на территориях циклических оледенений в плейстоцене [37]. Тем не менее очевидно, что мтДНК в качестве молекулярного маркера оказывается достаточно эффективным инструментом при решении задач дифференциации и определения степени дивергенции между симпатричными популяциями гольцов, представляющими удаленные филогенетические линии. Возможная интрогрессия мтДНК в данных случаях не составляет большой проблемы, так как фиксирует лишь историческую гибридизацию [43, 47, 48], и при исследовании аллопатричных популяций наблюдается реципрокная монофилия.

Из-за ограниченности генетических данных распространение арктической филогруппы в Северо-Западной Пацифике определяют по ареалу *S. taranetzi* [37, 38], который распространяется на водоемы арктического побережья Чукотки к востоку от р. Колыма до Берингова пролива и берингоморского побережья Чукотки к югу до р. Апука [49]. Водоемы арктического и берингоморского побережий Восточной Чукотки относятся к зоне перекрывания ареалов северной мальмы *S. m. malma* и гольца Таранца *S. taranetzi* [49]. В настоящее время получены свидетельства о послеледниковом вторичном контакте представителей разных филогенетических групп гольцов рода *Salvelinus* в области от Таймыра до Чукотки, включая бассейн р. Колыма [50–52]. Согласно нашим данным, территория Камчатки также заселялась общим предком арктической филогруппы гольца Таранца и представляет контактную зону между берингийской и арктической филогенетическими группами.

Исследование поддержано Программой фундаментальных исследований ДВО РАН “Дальний Восток” (проект № 15-I-6-0140).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях: 3-е изд. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2003. 431 с.
2. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с.
3. Глубоковский М.К., Черешнев И.А., Черненко Е.В., Викторовский Р.М. Распространение гольцов (*Salvelinus*, Salmoniformes) арктической группы на азиатском побережье Тихого океана / Систематика и экология рыб континентальных водоемов Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1979. С. 86–98.
4. Глубоковский М.К., Черешнев И.А. Филогения гольцов: проблемы и возможные пути их решения // Биология пресноводных животных Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1982. С. 3–22.
5. Черешнев И.А. К вопросу о таксономическом статусе симпатрических проходных гольцов рода *Salvelinus* (Salmonidae) Восточной Чукотки // Вопр. ихтиологии. 1982. Т. 22. Вып. 6. С. 922–936.
6. Волобуев В.В., Васильева Е.Д., Савваитова К.А. О систематическом статусе чукотских проходных гольцов рода *Salvelinus* // Вопр. ихтиологии. 1979. Т. 19. Вып. 3. С. 410–418.
7. Савваитова К.А. Арктические гольцы (структура популяционных систем, перспективы хозяйственного использования). М.: Агропромиздат, 1989. 223 с.
8. Фролов С.В. Дивергенция кариотипов чукотских гольцов рода *Salvelinus* // Докл. РАН. 1997. Т. 357. № 5. С. 703–705.
9. Картавцев Ю.Ф., Глубоковский М.К., Черешнев И.А. Генетическая дифференциация и изменчивость двух симпатричных видов гольцов (*Salvelinus*, Salmonidae) Чукотки // Генетика. 1983. Т. 19. № 4. С. 584–593.
10. Омельченко В.Т., Салменкова Е.А. Генетические различия гольцов арктической группы (*Salvelinus alpinus* L., *Salvelinus taranetzi* Kaganovsky) и тихоокеанской мальмы (*Salvelinus malma* Walbaum) // Генетика. 1998. Т. 34. № 11. С. 1518–1522.
11. Омельченко В.Т., Салменкова Е.А., Малинина Т.В., Фролов С.В. Генетическая дифференциация симпатричных популяций гольцов рода *Salvelinus* озера Аччен (Чукотский полуостров) // Генетика. 1998. Т. 34. № 3. С. 399–405.
12. Радченко О.А. Изменчивость митохондриальной ДНК гольцов рода *Salvelinus*. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2005. 153 с.
13. Сенчукова А.Л., Павлов С.Д., Есин Е.В. и др. Гольцы рода *Salvelinus* из озера Начикинское (Камчатка) и их положение в филогенетической системе *S. alpinus*–*S. malma* // Вопр. ихтиологии. 2015. Т. 55. № 1. С. 74–81.
14. Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков В.А. Дифференциация мальмы *Salvelinus malma* и гольца Таранца *Salvelinus taranetzi* по данным PCR-RFLP анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2004. Т. 40. № 3. С. 386–392.
15. Олейник А.Г., Скурихина Л.А. Генетическая дивергенция симпатричных гольцов рода *Salvelinus* из озера Начикинское (Камчатка) // Генетика. 2007. Т. 43. № 8. С. 1097–1106.
16. Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Bondar E.I., Brykov V.A. Phylogeography of northern Dolly Varden *Salvelinus malma malma* based on analysis of mitochondrial DNA // J. Zool. Syst. Evol. Res. 2014. V. 52. P. 293–304.
17. Uiblein F., Jagsch A., Honsig-Erlenburg W., Weiss S. Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters // J. Fish Biol. 2001. V. 59 (Suppl. A). P. 223–247.
18. Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H. et al. DNA barcoding Australia’s fish species // Phil. Trans. Roy. Soc. B – Biol. Sci. 2005. V. 360. P. 1847–1857.

19. Cockerham C.C. Analysis of gene frequencies // Genetics. 1973. V. 74. P. 679–700.
20. Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F statistics for the analysis of population structure // Evolution. 1984. V. 38. P. 1358–1370.
21. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. 1992. V. 131. P. 479–491.
22. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Res. 2010. V. 10. P. 564–567.
23. Nei M., Tajima F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases // Genetics. 1981. V. 97. P. 145–163.
24. Nei M. Molecular evolutionary genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
25. McElroy D., Moran P., Bermingham E., Kornfield I. REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data // J. Heredity. 1992. V. 83. P. 153–158.
26. Rogers A.R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // Mol. Biol. Evol. 1992. V. 9. P. 552–569.
27. Excoffier L. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model // Mol. Ecol. 2004. V. 13. P. 853–864.
28. Bandelt H.-J., Foster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
29. Tamura K., Kumar S. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages // Mol. Biol. Evol. 2002. V. 19. P. 1727–1736.
30. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. P. 512–526.
31. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
32. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874. doi 10.1093/molbev/msw054
33. Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Brykov V.A. Divergence of the *Salvelinus* species mitochondrial DNA from northeastern Asia // Ecol. Freshwater Fish. 2007. V. 16. № 1. P. 87–98.
34. Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков В.А. Филогения голец рода *Salvelinus* по данным анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2015. Т. 51. № 1. С. 63–77.
35. Kulathinal R.J., Singh R.S. A biographic genetic approach for testing the role of reinforcement: the case of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis* // Evolution. 2000. V. 54. № 1. P. 210–217.
36. Осинов А.Г. Арктический голец *Salvelinus alpinus* Забайкалья и Таймыра: генетическая дифференциация и происхождение // Вопр. ихтиологии. 2002. Т. 42. № 2. С. 149–160.
37. Brunner P.C., Douglas M.R., Osinov A. et al. Holarctic phylogeography of arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences // Evolution. 2001. V. 55. № 3. P. 573–586.
38. Moore J.-S., Bajno R., Reist J. D., Taylor E. B. Post-glacial re-colonization of the North American Arctic by Arctic Char (*Salvelinus alpinus*): genetic evidence of multiple northern refugia and hybridization between glacial lineages // J. Biogeography. 2015. V. 42. P. 2089–2100.
39. Иванкова Е.В., Ефремов В.В. Географическая изменчивость и темпоральная дифференциация популяций кеты *Oncorhynchus keta* некоторых районов Дальнего Востока России // Генетика. 2009. Т. 45. № 6. С. 813–824.
40. Brykov V.A., Polyakova N.E., Skurikhina L.A. et al. Analysis of mtDNA indicates weak temporal population structure of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*, Walbaum) in two rivers of Sakhalin Island // J. Fish Biol. 1999. V. 55. № 3. P. 617–635.
41. Churikov D., Gharrett A.J. Comparative phylogeography of the two pink salmon broodlines: an analysis based on a mitochondrial DNA genealogy // Mol. Evol. 2002. V. 11. P. 1077–1101.
42. Alekseyev S.S., Bajno R., Gordeeva N.V. et al. Phylogeography and sympatric differentiation of the Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.) complex in Siberia as revealed by mtDNA sequence analysis // J. Fish Biol. 2009. V. 75. P. 368–392.
43. Yamamoto S., Maekawa K., Morita K. et al. Phylogeography of a salmonid fish, Dolly Varden (*Salvelinus malma*): multiple glacial refugia in the north pacific rim // Zool. Science. 2014. V. 31. P. 660–671.
44. Smith G.R. Introgression in fishes: significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates // Syst. Biol. 1992. V. 41. P. 41–57.
45. Черешнев И.А. Биологическое разнообразие пресноводной ихтиофауны северо-востока России. Владивосток: Дальнаука, 1996. 198 с.
46. Dlugosch K.M., Parker I.M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and role of multiple introductions // Mol. Ecol. 2008. V. 17. P. 431–449.
47. Yamamoto S., Kitano S., Maekawa K. et al. Introgressive hybridization between Dolly Varden *Salvelinus malma* and white-spotted charr *Salvelinus leucomaenis* on Hokkaido Island, Japan // J. Fish Biol. 2006. V. 28. Suppl. A. P. 68–85.
48. Taylor E.B., May-McNally S.L. Genetic analysis of Dolly Varden (*Salvelinus malma*) across its North American range: evidence for a contact zone in south-central Alaska // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2015. V. 72. № 7. P. 1048–1057.

49. Черешнев И.А., Волобуев В.В., Шестаков А.В., Фролов С.В. Лососевидные рыбы Северо-Востока России. Владивосток: Дальнаука, 2002. 496 с.
50. Осинов А.Г., Алексеев С.С., Кирилов А.Ф. Арктический голец *Salvelinus alpinus* из озера Улахан-Сильян-Кюель (бассейн реки Яны): биология, морфология, генетика, филогения // Вопр. ихтиологии. 2003. Т. 43. № 1. С. 58–72.
51. Osinov A.G., Senchukova A.L., Mugue N.S. et al. Speciation and genetic divergence of three species of charr from ancient Lake El'gygytgyn (Chukotka) and their phylogenetic relationships with other representatives of the genus *Salvelinus* // Biol. J. Linn. Soc. 2015. V. 116. № 1. P. 63–85.
52. Osinov A.G., Volkov A.A., Alekseyev S.S. et al. On the origin and phylogenetic position of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* complex, Salmonidae) from Lake Cherechen' (middle Kolyma River basin): controversial genetic data // Polar Biol. 2016. doi 10.1007/s00300-016-2000-4

Secondary Contact between two Divergent Lineages of Charrs of the Genus *Salvelinus* in the Northwest Pacific

A. G. Oleinik^{a, *}, L. A. Skurikhina^a, and A. D. Kukhlevsky^{a, b}

^a*Zhirmunsky Institute of Marine Biology, National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia*

^b*Department of Cell Biology and Genetics, Far East Federal University, Vladivostok, 690600 Russia*

*e-mail: alla_oleinik@mail.ru

The present-day contact zone between the Beringian and Arctic phylogenetic lineages of charrs of the genus *Salvelinus* in the Northwest Pacific is documented. A comparative analysis of the genetic differentiation and divergence indices for allopatric and sympatric populations of charrs and phylogenetic and genealogical analyses of the mtDNA haplotypes indicate that Lake Achchen and the Lake Pekulinskoe are the zones of secondary contact between *S. m. malma* and *S. taranetz*; Lake Nachikinskoe, between *S. m. malma* and *Salvelinus* sp. 4; and Lake Dal'nee, between *S. m. malma* and *S. krogiusae*. The level of divergence between phylogenetic groups of haplotypes considerably exceeds the range of intraspecific variability of *S. m. malma* and could not have been achieved after colonization of the lakes in conditions of sympathy. The obtained data suggest that the territory of Kamchatka was colonized by the common ancestor of the Arctic phylogroup of Taranetz charr.

Keywords: northern Dolly Varden, Taranetz charr, mitochondrial DNA, genealogy, sympatry.