

На правах рукописи



БОРОВИКОВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ФИЛОГЕОГРАФИЯ РЯПУШЕК *COREGONUS ALBULA* (L.) И  
*C. SARDINELLA VALENCIENNES* ЕВРОПЕЙСКОГО СЕВЕРА РОССИИ**

03.00.15. – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



Москва – 2009

Работа выполнена в лаборатории эволюционной экологии Учреждения Российской академии наук Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук

Махров Александр Анатольевич

**Официальные оппоненты:**

академик РАН,  
доктор сельскохозяйственных наук,  
профессор

Глазко Валерий Иванович

кандидат биологических наук,  
доцент

Кузицин Кирилл Васильевич

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита диссертации состоится « 17 » июня 2009 г. в 15.00 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.203.05 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117 198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов», по адресу: 117 198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Автореферат разослан «12» мая 2009 г.

Ученый секретарь  
Совета по защите докторских  
и кандидатских диссертаций,  
кандидат биологических наук, доцент



О.Б. Гигани

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Европейская (*Coregonus albula*) и сибирская (*Coregonus sardinella*) ряпушки — важные объекты промысла. Крупные формы европейской ряпушки на протяжении нескольких десятилетий активно использовались для зарыбления ряда водоемов (Лопатышкина, 1957; Перельгин, 1988). Вместе с тем, для успешной интродукции и развития селекционных программ требуются данные об особенностях генофонда видов и отдельных популяций (Вавилов, 1987).

В настоящее время популяции ряпушки Западной Европы исследованы достаточно хорошо с применением различных молекулярно-генетических маркеров. Однако значительная часть ареала ряпушек находится на территории нашей страны, а популяции водоемов Европейского Севера России изучены значительно хуже. Имеются лишь данные по аллозимному полиморфизму отдельных популяций (Перельгин, 1988; Сендек, 1998; Sendek, 2002; Sendek et al., 2008), в то время как полиморфизм митохондриальной ДНК (мтДНК) до сих пор не анализировали. Вместе с тем, именно на Европейском Севере России, согласно распространенной точке зрения, в районе реки Печора, находится зона перекрывания ареалов двух видов ряпушек, где возможна их гибридизация (Решетников, 1980). Более того, не ясны особенности формирования популяций и пути послеледникового расселения ряпушек по европейской территории России, а эти данные необходимо учитывать при оценке степени уникальности популяций в ходе разработки мер по их поддержанию и восстановлению.

В то же время для многих популяций ряпушек проблема характеристики генофонда стоит еще более остро, поскольку до сих пор нет единого мнения в отношении их систематического статуса. Так, некоторые авторы считают отдельными видами крупную и мелкую формы, а также формы с разным временем и местом нереста и нагула (Svårdson, 1979, 1988; Kottelat, Freyhof, 2007). Более того, с 1970-х годов обсуждается и видовой статус *C. albula* и *C. sardinella*, которых ряд исследователей предлагает считать одним широко распространившимся видом евразийской ряпушки (Дрягин и др., 1969; Пирожников и др., 1975).

С этой точки зрения особый интерес представляют популяции Европейского Севера России, особенно те, которые обитают в районе реки Печора и на прилегающих территориях. Выявление закономерностей в расселении ряпушек по территории Европейского Севера России облегчит решение аналогичных задач для других представителей рода *Coregonus*, поскольку не только для ряпушек, но и для сига

проблемы, связанные с таксономическим статусом, особенностями формирования популяций и взаимодействием разных филогенетических линий вида стоят очень остро (обзор: Махров, Болотов, 2006).

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы стало изучение путей расселения и особенностей формирования современных популяций ряпушки на территории Европейского Севера России. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) изучить полиморфизм митохондриальной ДНК в популяциях ряпушек европейской территории России;
- 2) на основе данных молекулярно-генетического анализа оценить таксономический статус популяций ряпушки исследуемой территории;
- 3) с целью сопоставления оценок таксономического статуса, сделанных на основании молекулярно-генетического анализа, с имеющимися в литературе представлениями о статусе конкретных популяций, проанализировать собственные и литературные данные о морфологических особенностях разных форм ряпушек;
- 4) оценить степень участия ряпушки Сибири в формировании популяций ряпушки Европейского Севера России;
- 5) с использованием комплекса молекулярно-генетических характеристик установить возможные пути расселения ряпушек по территории Европейского Севера России с учетом палеогеографических реконструкций.

#### Научная новизна

Методом ПЦР-ПДРФ анализа в работе изучено разнообразие мтДНК ряпушек 16 популяций Европейского Севера России, Финляндии и Литвы, для которых подобные исследования ранее не проводили. На основе полученных данных описано 32 новых комплексных гаплотипа мтДНК. Кроме того, проанализированы нуклеотидные последовательности участка гена ND-1 мтДНК для 26 особей ряпушек *C. albula* и *C. sardinella* и пеляди *C. peled* — вида, близкородственного ряпушкам. Секвенированные последовательности депонированы в Международную базу данных GenBank.

Показано, что наибольшее разнообразие мтДНК характерно для ряпушки озера Плещеево, что свидетельствует о древности и длительной изоляции этой популяции. На основании морфологического и молекулярно-генетического анализа получены новые данные, свидетельствующие об отсутствии четкой и однозначно трактуемой дифференциации ряпушек Европы и Сибири, в том числе, по признакам,

предложенным в качестве диагностических для двух видов. Это подкрепляет гипотезу о едином виде свразийской ряпушки, предложенную еще в 70-х годах прошлого столетия (Драгин и др., 1969; Пирожников и др., 1975), которая, однако, до сих пор не является общепризнанной.

На основании собственных и литературных данных по разнообразию аллозимных и митохондриальных маркеров разработана оригинальная модель заселения ряпушкой Европейского Севера России в период отступления последнего ледника (20 000 – 7 000 лет назад). Оказалось, что кроме потока генов из Сибири в Европу, указания на существование которого приводились в литературе и ранее (Махров и др., 2003), в период формирования современных популяций ряпушки Севера России, по всей видимости, имел место и обратный поток генов — из Европы в Сибирь. В работе впервые получены указания на существование неизвестного ранее приледникового рефугиума, который мог располагаться южнее или юго-восточнее современного Онежского озера.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные в работе данные о полиморфизме мтДНК в популяциях ряпушек вносят вклад в реконструкцию путей заселения Европейского Севера России гидробионтами и должны учитываться при трактовке данных, касающихся генетического полиморфизма популяций других видов. Результаты работы должны быть приняты во внимание при обсуждении проблем систематического статуса отдельных популяций ряпушек, а также могут служить одним из аргументов в пользу объединения *C. albula* и *C. sardinella* при обсуждении этого вопроса специалистами в области таксономии.

На практике полученные данные могут быть использованы для оценки степени уникальности популяций ряпушек или выбора популяций, обладающих наибольшим генетическим разнообразием, что необходимо при разработке мер по их восстановлению, охране, а также при разработке селекционных программ. Данные, полученные в работе, необходимы для оценки результатов и последствий интродукции ряпушки из популяций Европейского Севера России в другие водоемы.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Современные популяции ряпушки Европейского Севера России формировались по мере отступления ледника с юга на север. В ходе расселения ряпушки по территории европейской части России кроме потока генов из Сибири существовал поток генов из Европы в Сибирь.

2. Южнее или юго-восточнее современного Онежского озера существовал приледниковый рефугиум, из которого произошло заселение ряпушкой восточной части бассейна Балтийского моря и водоемов западного побережья Белого моря. Потомки ряпушки из этого же рефугиума расселились вдоль побережья Северного Ледовитого океана на северо-восток.

3. Отсутствие четкой и однозначно трактуемой дифференциации ряпушек Европы и Сибири, в том числе и по признакам, предложенным в качестве видовых, позволяет обсуждать гипотезу о едином виде евразийской ряпушки.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации были представлены на III Международной конференции «Проблемы вида и видообразования» (Томск, 20-22 октября 2004 г.); на научно-практической конференции, посвященной 15-летию национального парка «Водлозерский» (Петрозаводск, 27-28 апреля 2006 г.), на I Всероссийской молодежной научной конференции «Молодежь и наука на Севере» (Сыктывкар, 14-18 апреля 2008 г.).

По теме диссертации сделаны доклады на научном семинаре лаборатории популяционной генетики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (Москва, апрель 2007), научном семинаре Отдела генетики животных Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (Москва, 29 ноября 2007 г.), а также на расширенном заседании Лаборатории эволюционной экологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (пос. Борок Ярославской обл., 26 марта 2009 г.).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, 1 работа находится в печати.

### **Структура и объем работы**

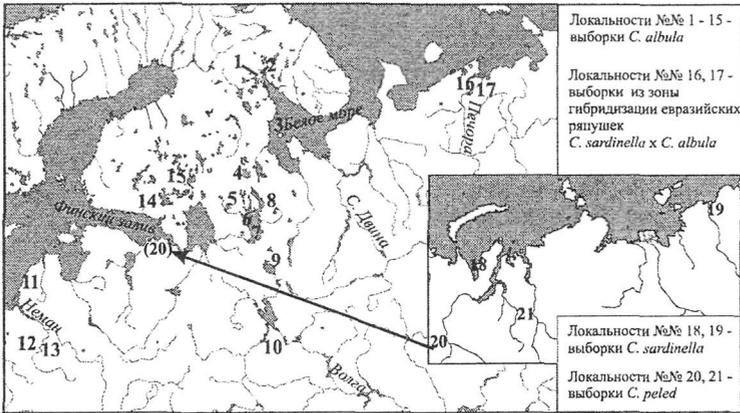
Диссертационная работа изложена на 175 страницах. Она состоит из введения, 5-и глав (главы 1 (обзор литературы), главы 2 (материалы и методы), 2-х глав, посвященных результатам исследования и 2-х глав, посвященных обсуждению результатов), заключения, выводов, списка литературы, включающего 235 источников, и 6 приложений. Работа содержит 18 рисунков и 14 таблиц.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

#### Исследованные популяции

Разными методами (морфологическими и молекулярно-генетическими) в работе исследовано 775 особей трех видов рыб из 22 водоемов Европейского Севера и Сибири. В сборах присутствовали ряпушки *C. albula* и *C. sardinella*, а также пелядь *C. peled* (вид, наиболее близкий ряпушкам). Непосредственно водоемы Европейского Севера России представлены 688 особями ряпушки из 13 популяций, среди которых были рыбы как мелкой, так и крупной формы (килец Онежского озера). Для сравнения изучен полиморфизм мтДНК *C. albula* пяти популяций (74 особи) из сопредельных стран — Финляндии и Литвы. Места сбора материала указаны на рис. 1.



**Рис. 1.** Места сбора выборок ряпушек *C. albula* и *C. sardinella*, а также пеляди *C. peled*. Условные обозначения: 1 – оз. Варацкое; 2 – оз. Старушечье; 3 – озера Соловецких островов (Большое Красное, Нижний Перт, Средний Перт, Гремячее); 4 – оз. Сегозеро; 5 – оз. Сямозеро; 6 – оз. Онежское, мелкая форма ряпушки; 7 – оз. Онежское, крупная форма ряпушки (килец); 8 – оз. Водлозеро; 9 – оз. Белое; 10 – оз. Плещеево; 11 – оз. Плателяй (Plateliai); 12 – оз. Гальве (Galve); 13 – оз. Даугай (Daugai); 14 – оз. Вирмаярви (Virmajarvi); 15 – оз. Каллавеси (Kallavesi); 16 – р. Печора, форма «саурей»; 17 – р. Печора, форма «зельдь»; 18 – водоемы Западного Ямала; 19 – р. Индигирка; 20 – оз. Ендырь, бассейн р. Обь; 21 – бассейн р. Енисей. Стрелка указывает направление перевозки пеляди из обского бассейна в прудовое хозяйство ФГУП ФСГЦ (пос. Ропша Ленинградской обл.), откуда были получены пробы для молекулярно-генетического анализа

#### Морфологический анализ

Морфологический анализ проводили согласно общепринятой схеме измерений сиговых рыб (Правдин, 1966). Для корректного сравнения промеров рыб из разных популяций, разного возраста и пола использовали индексы — процентные отношения линейных промеров участков тела, плавников и т.д. к длине тела, измеренной от конца рыла до конца средних лучей хвостового плавника (длина тела по Смитту). В случае

промеров, относящихся к голове, длины выражали в процентах длины головы, измеренной от конца рыла до заднего края жаберной крышки (Правдин, 1966).

#### Анализ полиморфизма изолюкусов креатинкиназы *СК-А1,2\**

Электрофорез проб, представляющих собой растворимую фракцию белка мышечной ткани, проводили в 7,5%-ном полиакриламидном геле с использованием трис-ЭДГА-боратной буферной системы (ТЕВ) (Peacock et al., 1965). Поскольку креатинкиназа является основным растворимым белком белых мышц, фермент выявляли на гелях при помощи неспецифического окрашивания на общий белок (Гааль и др., 1982, с модификациями). При интерпретации фенотипов фермента и определении генотипов использовали работу (Sendek, 2002). Обозначения изолюкусов приведены по (Shaklee et al., 1990), подвижности аллелей — согласно работе (Bodaly et al., 1991).

#### ПЦР-ПДРФ анализ мтДНК

Тотальную клеточную ДНК выделяли из замороженных или фиксированных этанолом (1:5) тканей методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Фрагмент мтДНК длиной около 2050 п.н., включающий полиморфный у представителей сиговых ген ND-1, кодирующий субъединицу 1 NADH-дегидрогеназного комплекса, амплифицировали с применением праймеров, разработанных (Stonin et al., 1993):

LGL381: 5'-ACCCCGCCTGTTACCAAAAACAT-3' (прямой);

LGL563: 5'-GGTTCATTAGTGAGGGAAGG-3' (обратный).

Амплификацию проводили в соответствии с программой, предложенной в этой работе. Полиморфизм длин рестриктных фрагментов изучали при помощи рестриктаз *Ase I*, *BstI* I, *BstU* I, *Dde I*, *Dpn* II, *Hae* III, *Hha* I, *Hinc* II, *Hinf* I, *Hph* I, *Msp* I, *Nci* I, *Rsa* I, *Tag* I. Фрагменты, генерируемые рестриктазами, разделяли в 2-2,5% агарозном геле, а в случае *BstI* I — в 1,3% агарозном геле. Продукты расщепления рестриктазами *Dde* I и *Hae* III дополнительно анализировали в 11%-ном полиакриламидном геле с целью выявления полиморфизма, проявляющегося на уровне низкомолекулярных фрагментов. Агарозные и полиакриламидные гели окрашивали бромистым эгидием (0,5 мкг/мл, 15-20 мин) и фотографировали в ультрафиолете ( $\lambda=312$  нм). На основании полученных данных для каждого образца составляли комплексные гаплотипы.

#### Определение нуклеотидной последовательности участка гена ND-1 мтДНК

Секвенирование одного из участков амплифицированного ND-1 фрагмента проводилось на базе лаборатории «ЕвроГен» (Москва) на автоматическом секвенаторе с камерой для электрофореза MegaBACE-500 (48 капилляров) и набором реактивов

DYEnamic ET, Dye Terminator Cycle Sequencing KIT для Mega BACE DNA Analysis System. Для секвенирования были использованы разработанные нами праймеры:

F2-1: 5'-CTTGGCTCAGGCTGGGCCTCT-3' (прямой);

R2: 5'-GCGCAAGGTGTCATAGGA-3' (обратный).

При анализе первичной последовательности учитывали только участок ND-1 гена длиной 300 п.н., для которого первичная последовательность была прочитана с обоих праймеров для всех образцов.

#### Методы анализа данных

Каждая выборка, для которой был выполнен морфологический анализ, была охарактеризована с помощью основных описательных статистик, рассчитанных с помощью программы Excel пакета программ Microsoft®Office 2003 (производитель ©Корпорация Майкрософт (Microsoft Corporation), 1985-2003). Достоверность различий средних значений для каждого признака при попарном сравнении популяций оценивали с помощью критерия Фишера (F), который рассчитывали в программе One-way ANOVA пакета программ STATISTICA 6.0. (производитель *Software Technology*).

Частоты аллелей креатинкиназы рассчитывали в программе ISOLOCI (Waples, 1988). Гетерогенность частот аллелей *CK-A1,2\** и комплексных гаплотипов между выборками проверяли с использованием псевдовероятностного теста в программе CHIRXC (Zaykin, Pudovkin, 1993).

Для характеристики полиморфизма на уровне мтДНК использовали показатели нуклеотидного ( $\pi$ ) и гаплотипического ( $h$ ) разнообразия (Nei, 1987) популяций, оценки средней нуклеотидной дивергенции ( $D_{Nei}$ ) (Nei, Li, 1979) и индекс  $F_{ST}$  (Reynolds et al., 1983), которые рассчитывали в пакете программ Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2006). Как в случае нуклеотидной дивергенции, так и в случае индекса  $F_{ST}$  значимость тестировали с помощью пермутационной процедуры в Arlequin 3.01. Оценку степени полиморфизма на разных иерархических уровнях (внутрипопуляционном, межпопуляционном, межгрупповом) проводили с помощью программы AMOVA (Excoffier et al., 1992). Для построения медианной сети комплексных гаплотипов (Minimum Spanning Network, MSN), а также вариантов последовательностей, выявленных в ходе секвенирования, использовали программу Network 4.2.0.1. (Fluxus Technology Ltd.). Просмотр хроматограмм с результатами секвенирования осуществляли в программе SeqMan 4.00 (DNASTAR Inc.), а поиск сайтов рестрикции — с помощью ChromasPro 1.2. (Technelysium Pty Ltd).

Степень дивергенции нуклеотидных последовательностей оценивали в MEGA 4.0. (Tamura et al., 2007) с использованием модели Jukes-Cantor (Jukes, Cantor, 1969). Для

выяснения филогенетических взаимоотношений между последовательностями строили древо максимальной парсимонии (Maximum Parsimony, MP (Eck, Dayhoff, 1966; Fitch, 1971)) с использованием алгоритма обмена ближайших соседей при эвристическом поиске наиболее вероятной топологии и оценки длины ветвей древа (обзор: Ней, Кумар, 2004). Для построения древа использовали MEGA 4.0. При тестировании топологии MP-древа использовали бутстреп-поддержку для узлов ветвления. Для подготовки сведений о нуклеотидных последовательностях при депонировании их в международную базу данных GenBank (NCBI) использована программа Sequin 7.35.

## Результаты

### Морфологические особенности изученных популяций ряпушки

#### Европейского Севера России

Проанализированы меристические (счетные) и пластические признаки ряпушек из популяций со спорным систематическим статусом (озера Соловецких островов, Белое, Водлозеро). Особое внимание уделено признакам, которые рекомендовано использовать в качестве видовых для *C. albula* и *C. sardinella* — числу позвонков и отношению вентроанального расстояния к антедорсальному (VA/AD). Выявлена тенденция увеличения доли особей с большим числом позвонков в более северных популяциях, что ставит под сомнение диагностические возможности этого признака, поскольку наблюдаемая тенденция может объясняться различиями экологических условий в период эмбриогенеза ряпушек из южных и северных популяций.

В целом, большинство признаков ряпушек оказываются чрезвычайно пластичными (в том числе, VA/AD), что, судя по всему, способствует приспособлению популяций к условиям обитания в конкретном водоеме. В результате, большинство морфологических признаков позволяют различать лишь экологические формы внутри вида.

#### Полиморфизм изолюкусов креатинкиназы CK-A1,2\*

##### в исследованных популяциях ряпушки

Для большинства изученных популяций характерно преобладание частого у европейской ряпушки аллеля \*100 (табл. 1). Аллель \*110, первоначально описанный для сибирской ряпушки, встречается в водоемах Европейского Севера России с низкими частотами. Среди изученных в данной работе, исключение составила популяция озера Водлозеро, где частота аллеля \*110 достигла 40%. Редкий медленный аллель европейской ряпушки \*85 также отмечен лишь в популяции Водлозера. Таким образом, можно говорить о выделении ряпушки озера Водлозеро из ряда других изученных популяций и ее большей генетической близости к ряпушке Сибири, где,

согласно литературным данным, частоты аллеля \*110 имеют тот же порядок величины (Перелыгин, 1988; Politov et al., 2000). Ряпушка Соловецких островов по генотипам СК-А1,2\* оказалась типичной европейской ряпушкой, несмотря на то, что имела наибольшее число позвонков среди всех изученных нами популяций, что по морфологическим критериям сближало ее с ряпушкой Сибири.

**Таблица 1.** Частоты аллелей СК-А1,2\* в популяциях ряпушки, изученных в данной работе

№	Озеро	Аллель	СК-А1*		СК-А2*		
			*100	*110	*85	*100	*110
1	Большое Красное		1,000	0,000	0,000	1,000	0,000
2	Нижний Перт		1,000	0,000	0,000	1,000	0,000
3	Гремячее		1,000	0,000	0,000	1,000	0,000
4	Сегозеро		0,969	0,031	0,000	0,969	0,031
5	Сязозеро		0,980	0,020	0,000	1,000	0,000
6	Водлозеро		0,587	<b>0,413</b>	0,005	0,583	<b>0,412</b>
7	Плещеево		0,974	0,026	0,000	1,000	0,000
	Р		<0,001		<0,001		

**Жирным шрифтом** выделены нетипичные для ряпушки европейских водоемов частоты аллеля \*110. В последней строке приведены результаты теста на гетерогенность популяций по частотам аллелей каждого локуса

#### Полиморфизм митохондриальной ДНК в исследованных популяциях ряпушки

Набор из 14 рестриктаз позволил проанализировать полиморфизм 85 сайтов рестрикции, из которых 30 оказались полиморфными, что соответствует 1,46% последовательности ND-1 фрагмента. Наибольший полиморфизм отмечен по сайтам шести рестриктаз: *Bst*N I, *Hae* III, *Rsa* I, *Msp* I, *Nci* I, *Tag* I. Значительно ниже оказался уровень полиморфизма по сайтам *Ase* I, *Bst*U I, *Dde* I, *Dpn* II, *Hinc* II, в то время как сайты *Hha* I, *Hinf* I и *Hph* I у всех изученных особей оказались мономорфными.

#### Внутрипопуляционный полиморфизм ряпушки Европейского Севера России.

Всего в исследованных популяциях ряпушки обнаружено 34 комплексных гаплотипа. Преобладающим почти во всех популяциях оказался гаплотип E: он выявлен у 80,6% особей ряпушки. Наибольшее разнообразие характерно для популяции озера Плещеево, где обнаружено 16 комплексных гаплотипов, а оценки нуклеотидного и гаплотипического разнообразия превышали таковые для остальных популяций (табл. 2).

Характерной особенностью ряда популяций является наличие в них уникальных, то есть приуроченных только к конкретной популяции, гаплотипов. Уникальные гаплотипы отсутствовали в семи исследованных популяциях — из озер Варакское, Сегозеро, Каллавети, Вирмаярви, Нижний Перт, Старушечье, Гремячее.

Необходимо отметить, что в озере Водлозеро наряду с типичным для европейской ряпушки гаплотипом E обнаружен комплексный гаплотип, характерный для ряпушки Сибири – S. Данный факт наряду с обсуждавшимися выше особенностями полиморфизма креатинкиназы в популяции Водлозера представляет несомненный интерес, так как может свидетельствовать об интрогрессии генов сибирской ряпушки в водлозерскую популяцию. Однако в связи с тем, что, согласно данным ПДРФ-анализа, гаплотип S отличается от широко распространенного у ряпушки европейских водоемов гаплотипа E всего лишь одной нуклеотидной заменой (в сайте узнавания для *Rsa I*), нельзя априори утверждать, что появление этого гаплотипа — не результат обратной мутации. Разрешить вопрос об идентичности гаплотипов S типичной сибирской ряпушки и экземпляра из Водлозера можно используя более тонкий метод анализа – определение нуклеотидной последовательности, или секвенирование (см. ниже).

**Таблица 2.** Частоты комплексных гаплотипов (КГ), нуклеотидное ( $\pi$ ) и гаплотипическое ( $h \pm s.e.$ ) разнообразия в исследованных популяциях

КГ	Популяции															
	B	ON		VR	PLE	SG	VD	K	NP	GR	ST	KL	VRM	PLT	GL	DG
		ONm	ONk													
E	0,9	0,84	0,842	0,8	0,531	0,929	0,8	0,919	1	1	1	0,923	1	0,524	0,4	0,667
ALB1	0	0,03	0,053	0,2	0,033	0,071	0,1	0,041	0	0	0	0,077	0	0	0	0
ALB2	0	0	0,105	0	0,017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALB3	0	0	0	0	0,017	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,067
ALB4	0	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,067
S	0	0	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
УГ	0,1	0,1	0	0	0,402	0	0,08	0,040	0	0	0	0	0	0,476	0,6	0,199
N	30	40	19	5	60	14	50	49	52	4	20	13	10	21	15	15
$\pi$	0,0015	0,0023	0,0027	0,0032	0,0165	0,0008	0,003	0,0009	0	0	0	0,0012	0	0,0061	0,0073	0,0051
$h \pm s.e.$	0,19 $\pm 0,28$	0,28 $\pm 0,09$	0,29 $\pm 0,13$	0,40 $\pm 0,24$	0,70 $\pm 0,06$	0,14 $\pm 0,12$	0,35 $\pm 0,08$	0,16 $\pm 0,07$	0	0	0	0,15 $\pm 0,13$	0	0,64 $\pm 0,08$	0,66 $\pm 0,08$	0,56 $\pm 0,14$

**Условные обозначения:** B – оз. Белое; ONm – мелкая ряпушка Онежского озера; ONk – крупная ряпушка (килец) Онежского озера; VR – оз. Варацкое; PLE – оз. Плещеево; SG – оз. Сегозеро; VD – оз. Водлозеро; K – оз. Большое Красное; NP – оз. Нижний Перт; GR – оз. Гремячее; ST – оз. Старушечье; KL – оз. Каллавеси (Финляндия); VRM – оз. Вирмарви (Финляндия); PLT – оз. Плателей (Литва); GL – оз. Гальве (Литва); DG – оз. Даугай (Литва). УГ – уникальные комплексные гаплотипы; N – объем выборки. Гетерогенность популяций по частотам гаплотипов значима на 0,001 уровне

В целом, для исследованных популяций характерно уменьшение показателей внутрипопуляционного полиморфизма в направлении с юга на север. Так, нуклеотидное разнообразие для ряпушки Онежского озера превышает 0,002, в то время как в популяции озера Сегозеро этот показатель уже менее 0,001, а в наиболее северных озерах – Старушечье и Нижний Перт – 0,000.

*Межпопуляционный полиморфизм ряпушки Европейского Севера России.* Индексы дивергенции и степени разнообразия ( $F_{ST}$ ,  $D_{Ne}$ ) свидетельствуют о значительном отличии популяций Лигвы и озера Плещеево от ряпушки других водосмов Европейского Севера России и Финляндии. Полученные оценки позволяют предполагать древность этих популяций и длительную изоляцию от остальной ряпушки европейской территории России.

Необходимо отметить, что у ряпушки литовского озера Даугай обнаружен гаплотип ALB3, который, кроме того, с низкими частотами выявлен лишь у ряпушки озера Плещеево (табл. 2). Подобная ситуация наблюдается и для гаплотипа ALB4, который, в свою очередь, сближает эту литовскую популяцию с популяцией мелкой ряпушки Онежского озера; в других популяциях гаплотип ALB4 также не встречается. В то же время, в целом гаплотипический состав популяций ряпушек озер Даугай, Плещеево и Онежское значительно различается.

Дифференциация популяций двух симпатричных форм ряпушки Онежского озера — мелкой и крупной (килец) — невелика, что свидетельствует о близости этих форм, но значима ( $P < 0,05$ ), что говорит о существовании между ними репродуктивной изоляции.

*Анализ взаимосвязей между гаплотипами мтДНК ряпушки из исследованных популяций.* С целью анализа происхождения и взаимосвязей между комплексными гаплотипами мтДНК, обнаруженными в популяциях ряпушки, построена их медианная сеть. При конструировании сети в анализ включены как собственные данные, так и данные о гаплотипах сибирской ряпушки и пеляди, взятые из литературных источников (Polítov et al., 2000, 2007), а также гаплотип сига, определенный на основании первичной последовательности из базы данных GenBank, № NC002646 (Miya, Nishida, 2000).

Оказалось, что гаплотипы ряпушки образуют сеть в виде «звезды» с центральным гаплотипом E (рис. 2). Большинство комплексных гаплотипов происходят от центрального, как правило, в результате замены нуклеотида в одном сайте рестрикции. Максимальное число различий — в одиннадцати сайтах из 85 проанализированных — обнаружено между гаплотипами ALBP2 и ALBP10 из популяции озера Плещеево. А вот различия между гаплотипами сибирской ряпушки, пеляди и гаплотипом E, типичным для ряпушки Европейского Севера, невелики. В целом они могут быть даже меньше, чем различия между гаплотипами одной популяции *C. albula*.

Таким образом, предковым для большинства гаплотипов мтДНК, обнаруженных у ряпушки исследованного региона, можно считать гаплотип E. Более того, малое число

замен между ним и производными от него гаплотипами свидетельствует о сравнительно недавнем их возникновении. Наиболее сильно отличаются от Е большинство гаплотипов ряпушки из озера Плещеево, что еще раз подтверждает предположение о древности данной популяции.

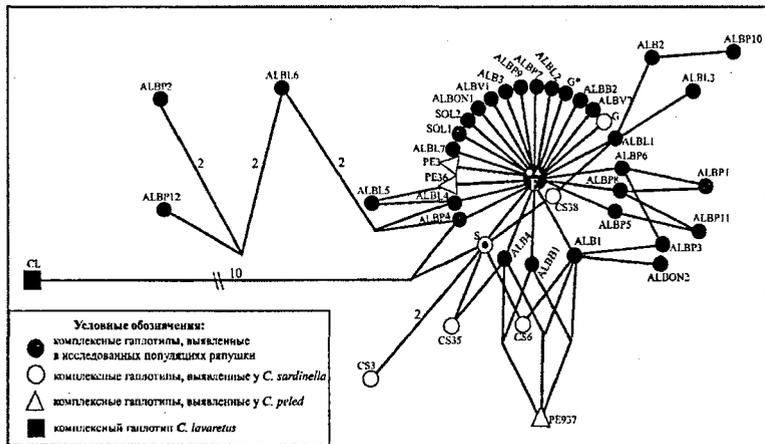


Рис. 2. Медианная сеть комплексных гаплотипов ряпушек Европы и Сибири, пеляди (*C. peled*) и сига (*C. lavaretus*). Информация о гаплотипах ряпушки Сибири (CS3, CS35, CS36, CS38) и пеляди (PE3, PE36, PE937) взята из работ Politov et al., 2000, 2007. Гаплотип S соответствует гаплотипу PE2, а гаплотип G – гаплотипу CS1 в работах Politov et al., 2000, 2007. Комплексный гаплотип сига (CL) описан на основе сиквенса № NC002646 базы данных GenBank. В случаях, когда гаплотипы различаются нуклеотидными заменами более чем в одном сайте рестрикции, число сайтов для них указано рядом с отрезком, соединяющим два гаплотипа. Фигуры внутри кружков, соответствующих гаплотипам E и S, показывают, что эти гаплотипы обнаружены в популяциях разных видов

В то же время, судить о направлении путей заселения ряпушкой водоемов европейской территории России на основании полученной сети гаплотипов затруднительно, поскольку большая часть замен между комплексными гаплотипами является одиночными заменами, специфичными для данного гаплотипа. Кроме того, ситуация осложняется высоким уровнем гомоплазии (наличием в сети гаплотипов петлевидных структур, обусловленных обратными или параллельными мутациями).

*Анализ нуклеотидной последовательности участка гена ND-1 мтДНК.* Выбор участка ND-1 фрагмента для секвенирования был связан с наличием в этой области наибольшего числа сайтов рестрикции, диагностических для разных видов сиговых, и необходимостью уточнить положение некоторых сайтов, позволяющих выявлять внутривидовое разнообразие у двух видов ряпушек. Длина проанализированного участка составила 300 п.н. (приблизительно 14,63% длины ND-1 фрагмента и около 1,82% всего генома мтДНК). Секвенированный участок находится в правой части ND-1

фрагмента; в полноразмерной последовательности мтДНК сига № NC002646 GenBank (Miya, Nishida, 2000) его положение соответствует участку от 3451 до 3752 п.н.

Образцы для анализа подбирали неслучайным образом. Чтобы оценить, насколько адекватно отражают данные рестриктоного анализа существующее разнообразие последовательностей, мы выбрали для секвенирования 12 образцов ряпушки из шести популяций Европы и Сибири, а также взяли для сравнения 3 образца пеляди из двух различных популяций. Все эти образцы объединяло то, что они относились к комплексному гаплотипу E, который, согласно данным ПЦР-ПДРФ анализа, наиболее широко распространен в популяциях европейской ряпушки (см. выше), встречается у сибирской ряпушки и доминирует у пеляди (Politov et al., 2000).

Кроме того, в анализ включили образцы ряпушки из Печоры, где, как считает ряд авторов, проходит зона гибридизации видов *C. albula* и *C. sardinella*. В связи с тем, что гаплотип E в выборке печорской ряпушки не встречался, для анализа первичной последовательности были использованы два образца с комплексным гаплотипом G, широко представленным в этой популяции. Гаплотип G отличался от гаплотипа E только наличием дополнительного сайта рестрикции *Taq* I. Для контроля в анализ была взята одна особь ряпушки из Онежского озера, которая, согласно данным ПЦР-ПДРФ анализа, также имела комплексный гаплотип G.

Более того, были проанализированы четыре образца ряпушки Печоры, для которых была известна принадлежность рыб к форме «саурей» или «зельдь». Согласно данным биологического и аллозимного анализа, считается, что группа рыб из Печоры, относящаяся к форме «саурей», близка к европейской ряпушке, а форма «зельдь» — к сибирской. Определить комплексный гаплотип с помощью рестриктоного анализа для этих проб, к сожалению, не удалось из-за значительной деградации ДНК, поэтому для секвенса в этом случае синтезировали укороченный фрагмент с праймеров F2-1 и R2.

Дополнительно была проанализирована первичная последовательность одного из образцов сибирской ряпушки (дельта Индигирки) с комплексным гаплотипом, характерным для Восточной Сибири (гаплотип S), а также последовательность образца ряпушки Водлозера с тем же, согласно ПЦР-ПДРФ анализу, комплексным гаплотипом.

Все исследованные нами последовательности депонированы в базу данных GenBank (NCBI) под номерами: *C. albula* — EU256379, EU339159-EU339165, EU339171-EU339174; *C. sardinella* — EU339154-EU339156; *C. peled* — EU339166-EU339170; ряпушка из реки Печора — EU339150-EU339153, EU339157, EU339158.

**Межвидовые и внутривидовые различия в изученной первичной последовательности.** Сопоставление первичных последовательностей ряпушек и

пеляди с последовательностью сига позволило установить, что все варианты фрагмента, секвенированные в нашей работе, отличаются от нее шестью общими нуклеотидными заменами (2% длины секвенированного участка) (табл. 3). К числу распространенных относится также замена А на G в положении 51. Она встречается во всех изученных образцах мтДНК пеляди и доминирует у ряпушек. Среди изученных образцов эта замена отсутствовала только у типичной сибирской ряпушки из бассейна Индигирки и одной ряпушки Водлозера, мтДНК которой согласно данным ПЦР-ПДФ анализа имела тот же комплексный гаплотип (S).

**Таблица 3.** Полиморфные нуклеотидные позиции для 9 вариантов последовательности нуклеотидов (общая длина участка 300 п.н.). Первая нуклеотидная позиция соответствует позиции 3451 п.н. сиквенса мтДНК сига *C. lavaretus* (GenBank № NC 002646). CL — последовательность сига из GenBank, остальные варианты последовательности зарегистрированы в образцах, секвенированных в данной работе

Вариант пос-ти	Позиция нуклеотида															
	3	6	15	24	51	84	105	132	162	173	228	240	246	252	255	291
CL	T	C	G	A	A	G	C	A	T	C	G	C	C	G	C	A
E-1	.	.	.	G	G	.	T	.	C	.	A	.	.	.	T	G
E-2	.	.	.	G	G	A	T	.	C	.	A	.	.	.	T	G
E-3	.	.	.	G	G	.	T	.	C	.	A	T	.	.	T	G
E-4	.	A	.	G	G	.	T	C	C	.	A	T	.	.	T	G
E-5	.	.	A	G	G	.	T	.	C	T	A	.	.	.	T	G
G-1	C	.	.	G	G	.	T	.	C	.	A	.	.	.	T	G
G*1	.	.	.	G	G	.	T	.	C	.	A	T	.	A	T	G
S-1	.	.	.	G	.	.	T	.	C	.	A	.	.	.	T	G
S-2	.	.	.	G	.	.	T	.	C	.	A	.	A	.	T	G

Анализ нуклеотидной последовательности участка гена ND-1 мтДНК ряпушек из шести популяций Европы и Сибири с одинаковым комплексным гаплотипом показал наличие полиморфизма, не регистрируемого методом ПДФ-анализа. Внутри «европейского» гаплотипа E были выявлены последовательности пяти типов (E-1—E-5), которые отличались друг от друга 1–5 нуклеотидными заменами (рис. 3). При этом характерных различий между носителями гаплотипа E из Европы и Сибири мы не обнаружили.

Данные секвенирования подтверждают, что из всех исследованных популяций Европейского Севера России ряпушка озера Водлозеро наиболее близка к сибирской, поскольку вариант мтДНК ряпушки Водлозера S-2 оказался производным от «сибирского», а не от «европейского» варианта.

Последовательность, характерная для двух образцов ряпушки из Печоры, которые имели дополнительный сайт рестрикции *Taq* I (комплексный гаплотип G), отличается, как оказалось, от варианта E-1 также только одним нуклеотидом. Это замена T на C в положении 3. А вот комплексный гаплотип G ряпушки Онежского озера, оказался не

идентичен гаплотипу *G* печорской ряпушки: дополнительный сайт рестрикции *Taq* I появлялся здесь тоже в результате единственной замены *G* на *A*, но в другом положении — 252 п.н., хотя длины фрагментов, генерируемых этой рестриктазой в случае образцов из Печоры (*G*) и Онежского озера (*G\**), оказывались сходными. Вариант нуклеотидной последовательности ряпушки из Онежского озера обозначен *G\*-1*.

В целом, уровень дивергенции изученных последовательностей невелик и варьирует от 0,003 до 0,017 (среднее значение  $0,009 \pm 0,003$ ), что соответствует дифференциации на внутривидовом уровне для рода *Coregonus* (Bernatchez et al., 1991; Hansen et al., 1999; Brzuzan et al., 2002; Schulz et al., 2006).

**Региональные особенности первичной последовательности изученного фрагмента мтДНК.** Анализ 26 первичных последовательностей фрагмента гена ND-1 мтДНК ряпушек и пеляди показал, что внутри группы последовательностей, объединенных общностью комплексного гаплотипа, доминируют два варианта — *E-1* и *E-3* (рис. 3). Причем если первый встречается повсеместно и обнаруживается не только у ряпушки европейского региона, но также у ряпушки Сибири и у пеляди, то второй вариант тяготеет к популяции *C. albula* Онежского озера и прилегающих районов. Характерной особенностью последнего является замена *C* на *T* в положении 240, а потому варианты *G\*-1* и *E-4* Онежского озера можно считать производными варианта *E-3* и объединить с ним в одну группу. Следует отметить, что данная замена характерна как для мелкой формы ряпушки Онежского озера, так и для кильца.

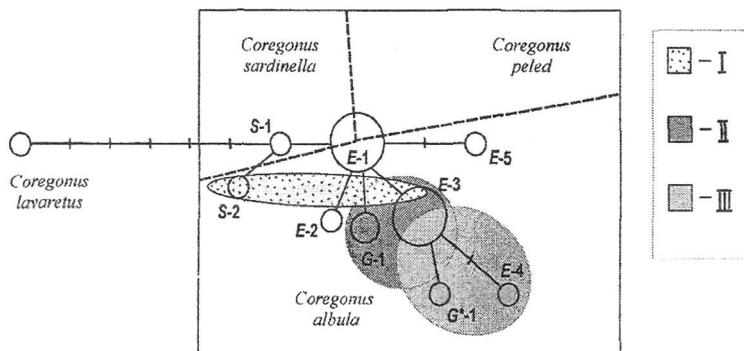


Рис. 3. Медианная сеть вариантов нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND-1 мтДНК. Диаметр круга отражает частоту встречаемости варианта последовательности; одно деление на схеме соответствует одной нуклеотидной замене. Варианты, оказавшиеся частично или полностью внутри геометрических фигур, выделенных цветом, присутствуют в одной из популяций, обитающих в зоне предполагаемого недавнего контакта *C. albula* и *C. sardinella*: I — Водлозеро, II — р. Печора, III — Онежское озеро. Пунктирная линия условно разграничивает три вида рода *Coregonus*, образующих единый комплекс

Помимо ряпушки Онежского озера, где все четыре проанализированных образца имели характерную замену, вариант *E-3* был обнаружен у двух ряпушек Водлозера с комплексным гаплотипом *E*. Встретился он и у четырех из шести проанализированных ряпушек из популяции Печоры, две из которых относились к форме «саурей», а две — к форме «зельдь». Из двух изученных особей, происходящих из водоемов Западного Ямала, одна также имела вариант последовательности *E-3*.

### Обсуждение

#### Молекулярно-генетические маркеры в решении проблем систематики комплекса евразийских ряпушек *C. albula* и *C. sardinella*

**Анализ полиморфизма изолюков *CK-A1,2\**.** Результаты анализа полиморфизма изолюков креатинкиназы *CK-A1,2\** показали, что большая часть исследованных нами популяций ряпушки можно отнести к виду *C. albula*, в том числе и соловецкую ряпушку. Необходимо отметить, однако, что в озере Большое Остречье, которое никогда не соединялось с другими искусственной системой каналов, обнаружены рыбы с «сибирским» аллелем \*110 (Гордеева и др., 2009). Этот факт можно трактовать как свидетельство иного происхождения ряпушки данного озера по сравнению с соловецкой ряпушкой, изученной нами, поскольку в литературе обсуждается возможность существования в некоторых озерах архипелага нативных популяций, основатели которых проникли сюда с материка естественным путем в послеледниковый период (Правдин, 1951). В то же время, в других озерах могут обитать потомки европейской ряпушки, интродуцированной туда монахами.

Что касается ряпушки озера Водлозеро, то высокие частоты аллеля *CK-A1,2\*110* сближают ее с сибирской. Интересно, что в озере Белом (Махров и др., 2003) и ряде озер западной части Архангельской области (Гордеева и др., 2009), где, как считается, обитает европейская ряпушка, частоты аллеля \*110 тоже весьма высоки, а кроме того, в этих популяциях обнаруживается характерный для сибирской ряпушки аллель \*120. В то же время, следует отметить, что популяции восточной части беломорского бассейна по частотам аллелей *CK-A1,2\** близки к типичной *C. albula* (Sendek et al., 2008).

Таким образом, в последнее время стали накапливаться данные, которые ставят под сомнение диагностическую ценность креатинкиназы при разделении двух видов ряпушек. Помимо приведенных фактов здесь следует отметить, что высокие частоты медленных «европейских» аллелей изолюков были обнаружены в бассейнах рек Анадырь и Чаун (Ермоленко, 1989), а также в некоторых популяциях *C. sardinella* Северной Америки (Бодали и др., 1994).

*Анализ внутри- и межпопуляционного полиморфизма мтДНК.* Согласно данным ПЦР-ПДРФ анализа ND-1 фрагмента мтДНК, уровень полиморфизма в изученных популяциях ряпушки находится в пределах, характерных для других представителей рода *Coregonus* (Bernatchez et al., 1991). Однако, в отличие от большинства видов, для ряпушек характерно исключительно высокое внутривидовое разнообразие, которое превышает межвидовое, что можно связать с наличием практически в каждой локальности уникальных гаплотипов на «общем фоне» гаплотипа E, уменьшающего межвидовую дифференциацию.

Высокие значения нуклеотидного разнообразия, отмеченные для озера Плещеево, свидетельствуют о древности этой популяции. Действительно, согласно палеогеографическим реконструкциям, во время последнего оледенения край ледника не продвигался так далеко на юг (Svendsen et al., 2004), в связи с чем данная популяция могла сохраниться еще с позднемосковского времени, т.е. с конца среднего плейстоцена (150 тыс. лет назад) (Алешинская и др., 1992).

Одной из причин высокого разнообразия литовских популяций является наличие в них не одного, как в большинстве популяций, а двух доминирующих гаплотипов, один из которых — широко распространенный гаплотип E, второй же — ALBL1 или ALBL4. Подобная ситуация описана для нескольких польских популяций *C. albula* (Brzuzan et al., 2002), что по мнению авторов этой работы, может свидетельствовать о большом числе основателей популяции или о смешении при формировании популяции от разных филогенетических линий, существовавших еще до последнего оледенения.

Снижение внутривидового разнообразия (нуклеотидного и гаплотипического) в направлении с юга на север, отмеченное нами для ряпушки Европейского Севера России, характерно для многих видов рыб северного полушария, формирование популяций которых связано с событиями последнего оледенения (Bernatchez, Wilson, 1998).

В целом же, анализ внутри- и межвидового полиморфизма ряпушки Европейского Севера России и двух популяций Финляндии позволяет говорить о близости большинства из них по происхождению. Дифференциация популяции озера Плещеево обусловлена ее большей древностью, а в формировании популяций Литвы, видимо, принимали участие разные филогенетические линии европейской ряпушки.

*Межвидовой полиморфизм фрагмента ND-1 мтДНК.* Многолетние исследования фрагмента ND-1 мтДНК методом ПЦР-ПДРФ анализа позволяют говорить лишь о незначительных различиях между популяциями ряпушек Европы и Сибири. Выполненный нами анализ первичной последовательности фрагмента гена

ND-1 мтДНК также не позволил обнаружить локусов, которые дали бы возможность различать *C. albula* и *C. sardinella*: у ряпушек Европы и Сибири в некоторых случаях были зарегистрированы абсолютно идентичные варианты нуклеотидной последовательности.

Даже в случае варианта, который, согласно данным ПЦР-ПДРФ анализа, считался типично сибирским (это заставляло предполагать, что его первичная последовательность содержит значительное число нуклеотидных замен по сравнению с последовательностью *C. albula*), различие ограничивалось, как оказалось, всего одним нуклеотидом. При этом различия между ряпушками из разных европейских популяций могли достигать пяти нуклеотидов, а внутри одной популяции — трех (Водлозеро — варианты S-2 и E-3, Онежское озеро — варианты G\*-1 и E-4).

Таким образом, характер распределения различных вариантов мтДНК в популяциях ряпушек Европы и Сибири свидетельствует в пользу гипотезы об их принадлежности к одному виду. Следует отметить, что и результаты ряда других исследований, касающихся полиморфизма мтДНК, указывают на незначительную дивергенцию *C. albula* и *C. sardinella* и не позволяют однозначно дифференцировать два вида ряпушек (Bematchez et al., 1991; Schulz et al., 2006). В то же время, нельзя не признать, что прямых доказательств, дающих твердые основания для объединения евразийских ряпушек, пока недостаточно. Даже если будет установлено, что другие участки мтДНК ведут себя аналогично изученному нами фрагменту, для обоснованного объединения *C. albula* и *C. sardinella* потребуются дополнительные данные не только по митохондриальной, но и по ядерной ДНК.

#### Основные пути расселения ряпушек по территории Европейского Севера России

Анализ полиморфизма ND-1 фрагмента мтДНК позволяет говорить об относительной древности популяции ряпушки озера Плещеево. Другие водоемы Европейского Севера России ряпушка начала заселять по мере отступления ледника (не ранее 20 000 – 15 000 лет назад), о чем свидетельствуют низкое нуклеотидное разнообразие и незначительная нуклеотидная дивергенция между популяциями, а также преобладание во всех популяциях одного комплексного гаплотипа (E). Следует отметить, что гаплотип E является, по всей видимости, достаточно древним, так как встречается во всех изученных нами популяциях, характерен для ряпушки Сибири, а также типичен для пеляди. Вероятно, рыбы с таким гаплотипом существовали на обширной территории, как Европы, так и Сибири еще со времен предпоследней регрессии ледника, а может быть и раньше.

Уникальные гаплотипы, характерные для конкретных локальностей, появлялись уже после того, как популяции оказались изолированными друг от друга в процессе отступления ледника и утратили связи с сетью приледниковых водоемов. Действительно, уникальные гаплотипы являются в большинстве случаев достаточно молодыми новообразованиями, так как отличаются от гаплотипа E заменой нуклеотида в единственном сайте рестрикции.

В то же время, особенности сети гаплотипов, выявленных методом ПЦР-ПДРФ анализа, не позволяют детально судить о потоках расселения ряпушки по исследуемой территории. Снижение гаплотипического и нуклеотидного разнообразия маркирует лишь движение потоков расселения на север, вслед за отступающим краем ледника. Однако ситуацию проясняют данные анализа нуклеотидной последовательности участка гена ND-1 мтДНК.

Результаты секвенирования подтверждают точку зрения о сибирском центре происхождения сиговых (Smith, 1957; Bauer, 1970; Решетников, 1980, 1995): именно в популяциях Восточной Сибири найден вариант мтДНК ряпушки (*C. sardinella*), наиболее близкий к варианту, характерному для сига (*C. lavaretus*). Судя по данным ПДРФ-анализа, в Сибири этот вариант является доминирующим (Polítov et al., 2000).

Есть все основания полагать, что на этапе первоначального проникновения ряпушки в Европу наиболее частым стал вариант последовательности E-1, который распространился в популяциях этой части света. По мере продвижения ряпушки на запад, произошедшего еще до последнего оледенения, в ее мтДНК постепенно накапливались отличия от последовательности предкового типа. Медианная сеть хорошо иллюстрирует данное предположение: одни из самых больших различий в последовательности изученного фрагмента мтДНК наблюдаются между образцами, собранными в удаленных друг от друга географических точках (например, дельта Индигирки (S-1) и озера Литвы (E-5)). Однако во время последней трансгрессии ледника популяции ряпушки были вытеснены из своих местообитаний, произошла фрагментация ареала.

В этот период значительную роль в сохранении популяций, а позже и в расселении ряпушки (как и других пресноводных рыб), безусловно, играли приледниковые водоемы, или рефугиумы. Так, на основе анализа аллозимного полиморфизма популяций сига высказано предположение о Восточно-Европейском рефугиуме (Sendek, 2004), который существовал наряду с приледниковыми водоемами в Сибири и приледниковым рефугиумом в районе современного Балтийского моря. Вероятно, в одном из приледниковых водоемов (возможно, впоследствии

фрагментированном) на территории Восточной Европы и сохранилась популяция ряпушки, из которой происходило ее расселение по территории Европейского Севера России после отступления ледника.

Наиболее вероятные потоки расселения, маркированные генетическими особенностями изученных популяций ряпушек Европейского Севера России, представлены на рис. 4.

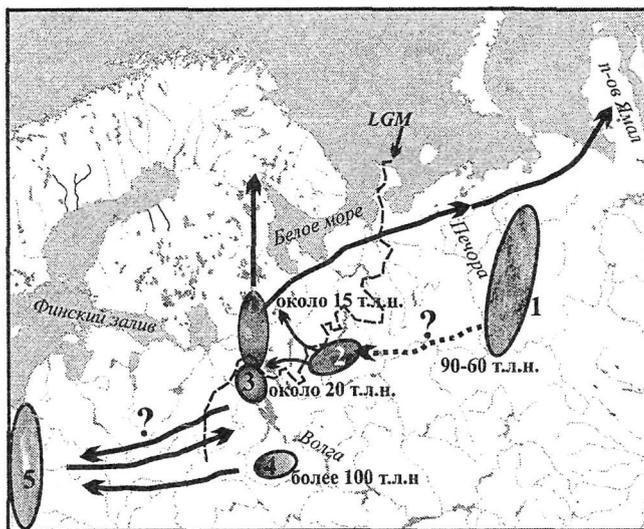


Рис. 4 Особенности расселения ряпушки по территории Европейского Севера России.

**Условные обозначения:** 1 – приледниковое озеро Коми; 2 – приледниковый рефугиум, из которого в водоемы восточной части Балтийского и Беломорского бассейнов проникли вселенцы из Сибири; 3 – приледниковый рефугиум, из которого происходило заселение современного Онежского озера и прилегающих водоемов; 4 – древний водоем, из которого произошло заселение ряпушкой современного озера Плесшеево; 5 – западноевропейские рефугиумы, ряпушка которых принадлежит к другим филогенетическим линиям. Стрелками показано направление потоков расселения. Поскольку на данном этапе исследований нельзя утверждать, что вселение из Сибири происходило именно через озеро Коми, стрелка показана точечным пунктиром. Пути обмена генами между западноевропейскими и восточно-европейскими рефугиумами также требуют уточнения. **LGM (пунктир)** — край ледника в период максимума последнего оледенения (по: Svendsen et al., 2004); т.л.н. – тысяч лет назад, по палеогеографическим реконструкциям

Так, обращает на себя внимание характерная особенность ряпушки Онежского озера, где все четыре изученных образца несли одну и ту же нуклеотидную замену (С на Т в положении 240, варианты последовательности E-3, E-4, G\*-1). Эта же замена присутствовала в митохондриальном геноме у обеих ряпушек с «европейским» комплексным гаплотипом E из соседнего озера Водлозеро. Западнее Онежского озера ни у исследованных нами особей ряпушки, ни у ряпушки Западной Европы (GenBank:

DQ399869, DQ399870; Kohlmann et al., 2007) данная нуклеотидная замена не обнаружена. В то же время, данная замена присутствовала в мтДНК у четырех из шести ряпушек Печоры, среди которых были как особи, относящиеся к «европейской» форме «саурей», так и рыбы, принадлежащие к «сибирской» разновидности «зельдь». Одна из двух проанализированных рыб с Западного Ямала тоже оказалась носителем этой замены.

Особенности распределения варианта *E-3* в пределах ареала ряпушек, а также то, что в Онежском озере были обнаружены также два производных от него варианта (*E-4* и *G\*-1*), содержащих ту же замену, заставляет предполагать существование в относительно недавнем прошлом потока генов из Европы в Сибирь. Этот поток шел, судя по всему, на поздних стадиях отступления ледника, поскольку характерная замена распространена на северо-восток от Водлозера к Печоре и Западному Ямалу. Северную локализацию данного потока подтверждают и результаты исследования полиморфизма креатинкиназы в популяциях ряпушки восточной части бассейна Белого моря: здесь отмечены только европейские варианты аллелей (Sendek et al., 2008).

Локализованное распределение вариантов мтДНК с характерной заменой (Онежское озеро, Водлозеро) свидетельствует о длительном периоде изоляции предковых популяций, несущих эту замену, то есть о наличии рефугиума. Этот водоем мог находиться южнее или юго-восточнее (но не западнее) современного Онежского озера, причем кроме потока расселения в северо-восточном направлении из бассейна Онежского озера существовал поток расселения в северном направлении (рис. 4).

В процессе отступления ледника, согласно как литературным, так и собственным данным, имел место и поток генов из Сибири в Европу. Об этом говорит присутствие в ряде популяций восточной части исследованного региона аллельных вариантов креатинкиназы, характерных для популяций ряпушки Сибири. Данные секвенирования фрагмента ND-1 мтДНК также подтверждают, что из всех исследованных популяций Европейского Севера России ряпушка озера Водлозеро наиболее близка к сибирской. О наличии потока генов из Сибири в Европу в период отступления последнего ледника свидетельствуют данные, полученные при генетическом анализе популяций не только рыб, но и других гидробионтов (обзор: Махров, Болотов, 2006).

На существование обмена генами между популяциями ряпушки исследованного региона и филогенетическими линиями Западной Европы указывают особенности полиморфизма мтДНК ряпушек озер Даугай, Онежское и Плещеево. В самом деле, их сближает наличие общих гаплотипов мтДНК, не обнаруженных в других популяциях. Более того, нуклеотидная последовательность ряпушки озера Даугай, как оказалось,

принадлежит к распространенному у ряпушек Европейского Севера России варианту E-1, в то время как последовательность особи из озера Гальве отличалась от E-1 двумя нуклеотидными заменами (вариант E-5).

Необходимо отметить, что в свете современных данных об истории развития оледенений на севере Евразии в четвертичном периоде, возможность существования разных рефугиумов, обсуждавшихся выше, подтверждается. В частности, согласно реконструкциям, приведенным в работах (Mangerud et al., 2004; Svendsen et al., 2004), юго-восточный край последнего ледника был сильно изрезан, что создает предпосылки для существования водоемов, изолированных друг от друга его лопастями (рис. 4).

Особенности филогеографии евразийских ряпушек позволяют выдвинуть две гипотезы для объяснения всей совокупности имеющихся данных. С одной стороны, можно предположить, что на Европейском Севере России существует обширная зона гибридизации двух видов. С другой стороны, низкий уровень генетических различий между ряпушками Европы и Сибири можно рассматривать в рамках представления об одном широко распространенном виде. Наблюдаемая дифференциация популяций ряпушки связана в этом случае с особенностями расселения вида с востока на запад.

Нет сомнений, что заселение ряпушкой европейской территории представляло собой довольно сложный и длительный процесс, а вселение в европейские водоемы разных филогенетических линий ряпушек происходило несколько раз. Ведь даже популяции, относящиеся, без всякого сомнения, к европейской ряпушке, имеют достаточно сложную историю. О присутствии на территории Европы ряпушек, происходящих, по крайней мере, от двух потоков вселения, свидетельствуют, например, результаты ПДРФ-анализа мтДНК *C. albulus* озер Польши (Brzuzan et al., 2002).

### Выводы

1. Впервые проведенное исследование мтДНК 11 популяций ряпушек Европейского Севера России и пяти популяций сопредельных стран показывает, что уровень внутри- и межпопуляционного полиморфизма у рыб изученного региона соответствует таковому для популяций других представителей рода *Coregonus*.

2. Согласно данным, полученным в работе, характерной особенностью ряпушек Европейского Севера России является преобладание внутривидового полиморфизма над межвидовым, что связано с наличием в большинстве популяций уникальных комплексных гаплотипов. Наибольшее внутривидовое разнообразие, не наблюдавшееся ни в одной из ранее изученных популяций Европы и Северной Америки, выявлено у ряпушки озера Плещеево, что свидетельствует о древности и длительной изоляции этой популяции.

3. Анализ морфологических и молекулярно-генетических признаков на основе собственных и литературных данных, выявил, что уровень различий между европейской и сибирской ряпушками крайне низок. При этом впервые получены свидетельства в пользу того, что наблюдаемые морфологические различия могут быть связаны не только с видовой принадлежностью ряпушек, историей расселения и формирования популяций, но и с их экологическими особенностями.

4. Полученные в работе данные об отсутствии четкой и однозначно трактуемой дифференциации ряпушек Европы и Сибири, в том числе и по признакам, предложенным в качестве видовых, позволяют обсуждать гипотезу о едином виде евразийской ряпушки.

5. В наиболее восточных из изученных популяций – озерах Белое и Волдозеро – обнаружены следы интрогрессии генов ряпушки Сибири, о чем свидетельствуют как данные по полиморфизму изолюсов креатинкиназы *CK-A1,2\**, так и данные по разнообразию последовательности ND-1 фрагмента мтДНК.

6. Согласно полученным данным по гаплотипическому разнообразию популяций ряпушек, современные популяции Европейского Севера России формировались по мере отступления ледника с юга на север. При расселении ряпушки по территории европейской части России, кроме потока генов из Сибири, выявлен также поток генов из Европы в Сибирь, который маркируется характерной заменой С на Т в положении 240 изученного фрагмента гена ND-1 мтДНК.

7. На основании данных по изучению первичной последовательности фрагмента ND-1 мтДНК впервые получено указание на существование рефугиума южнее или юго-восточнее современного Онежского озера.

#### Благодарности

Я искренне благодарна академику Ю.П. Алтухову, под руководством которого начинала исследование генетического разнообразия сиговых рыб. Благодарю за обсуждение и помощь в осмыслении полученных результатов В.С. Артамонову, а также всех сотрудников лаборатории эволюционной экологии ИБВВ РАН.

Я признательна за предоставленные пробы и помощь в ходе полевых работ Я.И. Алексеевой, В.С. Артамоновой, Т.С. Ивановой, А. Каупинису, В.В. Костюничеву, Ю.С. Решетникову, Д.С. Сендеку, О.П. Стерлиговой, С. Соколову, В.А. Широкову, М.Ю. Шрейдер, И.Л. Щурову, сотрудникам ИБВВ РАН, Вологодской лаборатории – филиала ФГНУ ГосНИОРХ, НП «Водозерский», лаборатории популяционной генетики ИОГен РАН и участникам международной экспедиции «Экология тундры-94».

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Боровикова Е.А., Балдина С.Н., Гордон Н.Ю., Махров А.А., Политов Д.В. 2006. Генетическое разнообразие, особенности морфологии и происхождения ряпушки оз. Водлозера // Водлозерские чтения: Материалы научно-практической конференции, посвященной 15-летию нац. парка «Водлозерский», Петрозаводск, 27-28 апреля 2006 г. Петрозаводск: Изд-во КНЦ РАН. С. 69-74.
2. Боровикова Е.А. 2008. Приледниковые рефугиумы сиговых рыб рода *Coregonus* на территории Европейского Севера России // Материалы докладов I Всероссийской молодежной научной конференции «Молодежь и наука на Севере». Т. 3. Сыктывкар, Республика Коми, Россия, 14-18 апреля 2008 г. С. 25-26.
3. Махров А.А., Боровикова Е.А., Артамонова В.С. 2008. Локализация приледниковых рефугиумов рыб на Европейском Севере России // Тезисы докладов Международной конференции «Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб», Санкт-Петербург, 10-12 сентября 2008 г. С. 103-104.
4. Боровикова Е.А., Алексеева Я.И., Артамонова В.С., Махров А.А., Шрейдер М.Ю. 2008. Систематическое положение ряпушки Соловецких озер (по морфологическим и генетическим данным) // Проблемы мониторинга природной среды Соловецкого архипелага. Материалы III Всероссийской научной конференции. Архангельск, 8-11 декабря 2008 г. С. 20-22.
5. Боровикова Е.А., Махров А.А. 2009. Обнаружение гаплотипа митохондриальной ДНК, характерного для сибирской ряпушки *Coregonus sardinella* (Valenciennes, 1848), в популяции европейской ряпушки *C. albula* (Linnaeus, 1758) Водлозера (бассейн Балтийского моря) // Известия РАН. Серия биологическая. № 1. С. 95-99.
6. Боровикова Е.А., Махров А.А. 2009. Систематическое положение и происхождение сигов (*Coregonus*, *Coregonidae*, *Osteichthyes*) Европы. Генетический подход // Успехи современной биологии. Т. 129. № 1. С. 58-66.
7. Боровикова Е.А., Махров А.А. 2009. Систематическое положение и происхождение сигов (*Coregonus*) Европы: Морфо-экологический подход // Лососевидные рыбы Восточной Фенноскандии (в печати).

Боровикова Елена Александровна (Россия)

Филогеография ряпушек *Coregonus albula* (L.) и *C. sardinella* Valenciennes

Европейского Севера России

В работе показано, что современные популяции ряпушки Европейского Севера России формировались по мере отступления последнего ледника с юга на север. Наиболее древней среди изученных является популяция озера Плещеево, для которой характерно максимальное внутривидовое разнообразие. В ходе становления генетической структуры популяций имели место контакты разных филогенетических линий ряпушек. В частности, получены новые данные, подтверждающие существование потока генов из Сибири в популяции Восточной Европы, а также обнаружена характерная замена в последовательности мтДНК, маркирующая поток генов в Сибирь из ранее неизвестного приледникового рефугиума, который мог располагаться южнее или юго-восточнее современного Онежского озера. Полученные данные хорошо согласуются с палеогеографическими реконструкциями, свидетельствующими об изрезанности края ледника и возможности существования у его периферии изолированных приледниковых водоемов. В то же время, вся совокупность морфологических и молекулярно-генетических данных свидетельствует о низком уровне различий между европейской (*C. albula*) и сибирской (*C. sardinella*) ряпушками, что позволяет обсуждать гипотезу о едином виде евразийской ряпушки.

Elena A. Borovikova (Russia)

Phylogeography of the Ciscoes *Coregonus albula* (L.) and *C. sardinella* Valenciennes

in European North of Russia

It has been demonstrated that modern cisco populations of European North of Russia were formed as the last glaciation retreated from the south to the north. The cisco population of Lake Pleshcheevo is the oldest of the studied populations and it characterized by the largest intrapopulation diversity. Different phylogenetic lineages of ciscoes contacted when the genetic structure of their populations was being formed. In particular, new evidence for a gene flow from Siberian populations to eastern European ones are presented. In addition, it was found a characteristic substitution in the mitochondrial DNA nucleotide sequence that marks a gene flow to Siberia from a previously unknown periglacial refugium, which was probably located to south or southeast of the modern Onega Lake. These data agree with paleogeographic reconstructions that indicate the margin of the glacier was indented, and isolated bodies of water could exist at its periphery. At the same time, all available morphological and molecular genetic data show only slight differences between the European vendace (*C. albula*) and the Siberian least cisco (*C. sardinella*), which makes it possible to hypothesise that Eurasian ciscoes are actually a single species.

Подписано в печать: 07.05.2009

Заказ № 2011 Тираж - 100 экз.

Печать трафаретная.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)