

УДК 575.17:597.553

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ КУНДЖИ *Salvelinus leucomaenis* (Pallas) РОССИЙСКОГО ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

© 2014 г. Е. А. Салменкова¹, В. Т. Омельченко², Г. А. Рубцова¹, К. И. Афанасьев¹,
Н. С. Романов², М. Ю. Ковалев²

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва 119991
e-mail: salm@vigg.ru

²Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток 690041

Поступила в редакцию 04.04.2013 г.

Популяционно-генетическая структура гольца кунджи *Salvelinus leucomaenis* (сем. Salmonidae) исследована на основе анализа изменчивости 10 микросателлитных локусов ДНК в выборках из разных районов ареала на Дальнем Востоке России. В нескольких выборках исследовали также изменчивость 21 аллозимного локуса, из которых 5 оказались полиморфными. Общий уровень изменчивости по исследованным маркерам соизмерим с таковым у близкого вида мальмы. Оценки межпопуляционной генетической дифференциации высокодостоверны в большинстве попарных сравнений выборок. Общие оценки пространственной генетической дифференциации у кунджи равны $F_{ST} = 0.203$ и $R_{ST} = 0.202$. Кластерный анализ и многомерное шкалирование на основе аллельных частот микросателлитных локусов показывают вероятное подразделение исследованных выборок на две основные группы: северную (представленную регионами: север Хабаровского края, Камчатка, Ямский залив) и южную (с регионами: Сахалин, Приморье, Курильские острова). Сходный характер дифференциации демонстрируют и аллозимные данные. Уровень внутри- и межпопуляционного генетического разнообразия в южной группе популяций выше, чем в северной. Тест на изоляцию расстоянием не выявляет значимой корреляции генетических и географических расстояний между выборками. Результаты исследования позволяют считать, что популяционно-генетическая структура кунджи сформировалась под воздействием исторических геолого-климатических преобразований ее ареала и генетического дрейфа, обусловленного относительно невысокой популяционной численностью и ограниченной по протяженности миграционной активностью ее проходной формы.

DOI: 10.7868/S0016675813100093

Кунджа *Salvelinus leucomaenis* (Pallas) (сем. Salmonidae) — широко распространенный вид гольцов в водоемах Северо-Востока и Дальнего Востока России. В уловах лососевых рыб кунджа, как и другие виды гольцов, не занимает лидирующих позиций, но ее по праву следует отнести к первоочередным промысловым резервам.

Ареал кунджи ограничен азиатским континентом, где он включает бассейны рек восточной и западной Камчатки, материкового побережья Охотского моря, Приморья, рек Курильского архипелага и Японии [1]. На этом пространстве кунджа таксономически однородна, но имеет несколько внутривидовых форм, встречающихся только в Японии. Единственное указание на существование популяций кунджи на Аляске и других районах западного побережья Северной Америки [2] не подтверждается ни предыдущими [3], ни последующими исследованиями ихтиофауны Аляски и Канады [4, 5].

По терминологии японских авторов, кунджа в российской части ареала представлена един-

ственной формой *S. leucomaenis* f. *leucomaenis*. В Японии, согласно последней ревизии, кроме названной обитают еще три эндемичные формы — *S. leucomaenis* f. *japonicus*, *S. leucomaenis* f. *pluvius* и *S. leucomaenis* f. *imbrius* [6, 7].

На ареале кунджа представлена в основном проходными популяциями, но имеет и жилые (среди них — три эндемичные японские формы), озерно-речные и речные экотипы. В ее популяциях встречаются карликовые (неотенические) самцы — половозрелая молодежь с речной окраской, не прошедшая стадию смолтификации и не скатывающаяся в море, успешно участвующая в нересте с нормальными взрослыми самками, т.е. составляющая единый генетический пул с остальной частью локальной популяции [8]. Характерной особенностью проходной кунджи являются ее многократные нагульные миграции на небольшие расстояния в море с возвращением в реки, где проходит ее зимовка и нерест.

Вместе с американской ручьевого палией *S. fontinalis* (Mitchill), озерной палией *S. namaycush*

Таблица 1. Выборки кунджи, проанализированные по микросателлитным и аллозимным (помечены *) локусам

Локальность	Размер выборки	Год сбора
1. оз. Благодатное, о-в Итуруп	48	2011
2. оз. Валентины, о-в Кунашир	48	2011
3. Ульбанский залив, Охотское море, Хабаровский край	34	2010
4. р. Малая Иски, Хабаровский край	23	2010
5. р. Омокой, о-в Большой Шантар, Хабаровский край	37	2010
6. оз. Лисье, о-в Феклистова, Хабаровский край	8	2010
7. р. Самарга, Приморье	28	2010
8. р. Виахту, Сахалин	36	2010
9. Бассейн р. Найбы (притоки Бол. Такой, Белая, Сухоплетка), Сахалин	31	2010
10. р. Ударница, Сахалин	17	2010
11. Ямский залив, Охотское море, Магаданская обл.	16	2009
12. Протока Азабачья, басс. р. Камчатка	17	2009
13. Устье протоки Азабачья + р. Радуга, басс. р. Камчатка	17	2005, 2009
14. р. Яма, северное побережье Охотского моря*	12	1994
15. р. Белая, приток р. Найбы, юго-вост. Сахалин*	15	1996
16. р. Долинка, охотское побережье, юго-вост. Сахалин*	15	1996
17. р. Илюшина, восточное побережье о-ва Кунашир*	15	1998
18. р. Петровка, восточное побережье о-ва Кунашир*	24	1998
19. р. Звездная, юго-вост. побережье о-ва Шикотан*	29	1998

(Walbaum) и арктическим гольцом *S. alpinus* L. кунджа относится к наиболее дивергировавшим таксонам в роде *Salvelinus*, чей видовой статус не подвергается сомнению. Такая таксономическая определенность явилась, по-видимому, одной из причин менее пристального изучения популяций кунджи по сравнению с другими гольцами. В спорных вопросах систематики гольцов она обычно выступает как пример “хорошего” вида-репера. По морфологическим признакам и занимаемому ареалу кунджу относят к тихоокеанской группе гольцов [9].

Генетические исследования кунджи на основе аллозимов и ДНК-маркеров были посвящены в основном японским популяциям, в том числе культивируемым [7, 10–13], либо касались отдельных российских [14, 15]. Кунджа – один из немногих видов лососевых, практически не затронутых на территории России хозяйственной деятельностью человека, поэтому она представляет интерес для популяционно-генетического исследования, с одной стороны, в качестве природного (“дикого”) вида, с другой – как перспективный объект для регионального рыболовства и культивирования, для управления которыми важна такого рода информация [16].

Популяционно-генетическая структура кунджи в российской части ареала практически не изучена. Настоящая работа посвящена анализу пространственной популяционно-генетической

структуры этого вида на основе микросателлитной изменчивости; кратко рассмотрен также материал по аллозимной изменчивости кунджи в небольшом числе популяций из разных районов ареала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Перечень и локализация выборок кунджи, проанализированных по аллозимным и микросателлитным маркерам, даны в табл. 1 и на рис. 1.

Для популяции р. Ямы использованы генетические данные, полученные нами ранее [14]. Кунджа южно-курильских популяций (реки Петровка и Звездная) отловлена сотрудником Биологического почвенного института ДВО РАН Ю.Н. Журавлевым в рамках Международной программы исследования Курильских островов (1997, 1998 гг.). Остальные выборки относятся к собственным сборам. Большинство выборок взяты из нижнего течения рек.

Анализ микросателлитных локусов. Проанализированы 10 микросателлитных локусов, приведенных в работе Афанасьева с соавт. [17] (табл. 2). В качестве образцов для ДНК-анализа использовали небольшой кусочек грудного плавника, фиксированный в 96%-ном этаноле. Выделение тотальной ДНК выполняли стандартным методом с использованием набора реагентов Diatom DNA Prep 200 фирмы “ИзоГен” (Россия). Поли-

меразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе MJ Research PTC-100 с использованием готовых лиофилизированных смесей для ПЦР Gene Pak PCR Core фирмы “ИзоГен” (Россия), с добавлением 5 мкл смеси праймеров (конечная концентрация 0.5 мкМ) и 5 мкл геномной ДНК (100 нг). Продукты амплификации фракционировали с помощью электрофореза в 6%-ном неденатурирующем полиакриламидном геле в 0.5× TBE буфере при напряжении 300 В в течение 2–5 ч. Полученные электрофореграммы окрашивали бромистым этидием и документировали в ультрафиолетовом свете. В качестве маркеров длин фрагментов использовали ДНК плазмиды pBR322, обработанные рестриктазами *Hae*III и *Hpa*II. Размеры аллелей по каждому локусу определяли с использованием программы 1D Image Analysis Software Version 3.5 фирмы “Кодак”.

Генетическую изменчивость в выборках по каждому микросателлитному локусу оценивали фактическим и эффективным числом аллелей и наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготностью, используя программу GenAlEx 6 [18]. С помощью программы GenPop 4.07 [19] оценивали отклонение от равновесия Харди–Вайнберга по каждому локусу, генотипическое неравновесие по сцеплению для всех пар локусов в каждой выборке, выполняли тесты на генотипическую и генную дифференциацию между выборками. Величину попарной и общей межвыборочной дифференциации оценивали по той же программе двумя показателями: коэффициентом F_{ST} , определяемым на основе анализа вариантов аллельных частот [20], и R_{ST} , определяемым на основе анализа вариантов размера аллелей [21]. Для оценки статистической значимости величин F_{ST} использовали тесты той же программы на генную дифференциацию по аллельным частотам, а значимость величин R_{ST} оценивали по [22]. Во всех случаях множественных тестов уровни значимости корректировали по Бонферрони.



Рис. 1. Географическая локализация выборок кунджи. Нумерация выборок дана в табл. 1.

Кластеризацию выборок на основе дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса [23], рассчитанных по частотам аллелей, и построение дендрограммы методом Neighbour-joining с бутстреп-оценками ветвлений дерева проводили с помощью пакета программ PHYLIP 3.65 (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip/html>). Для многомерного шкалирования выборок в пространстве главных координат использовали программу GenAlEx 6 [18], а для анализа изоляции расстоянием между выборками (тест Мантеля) – программу GenPop 4.07 [19]. Для иерархического анализа генетического разнообразия по микросателлитным локусам определяли показатель G_{ST} на разных уровнях

Таблица 2. Характеристика исследованных микросателлитных локусов кунджи

Локус	Повторяющаяся последовательность	Температура отжига, °С	Интервал аллельных размеров
<i>Omy301</i>	(CA) $_n$	50	62–80
<i>Smm3</i>	(CA) $_n$ CG(CA) $_n$	51	114–124
<i>Smm5</i>	(CA) $_n$ C(CA) $_n$	52	80–100
<i>Smm17</i>	(CA) $_n$	51	111–131
<i>Smm21</i>	(TC) $_n$ TTTC(TC) $_n$	54	113–129
<i>Ssa197</i>	(GT) $_n$ C(TG) $_n$ TC(TG) $_n$ A(GTGA) $_n$	52	114–126
<i>Ssa20.19</i>	(AC/TG) $_n$	51	81–91
<i>One109</i>	(TAGA) $_n$	56	88–156
<i>Sle6</i>	(CA) $_n$	50	85–99
<i>Sle5</i>	(GCGT) $_n$ (GT) $_n$	53	102–148

межгрупповой дифференциации по Неи [24], применяя с этой целью составленную в ИОГен РАН программу Б.А. Калабушкина; последняя дает результаты, близкие к полученным при анализе подразделения молекулярной вариации (AMOVA, в [18]).

Анализ аллозимных маркеров. Методами электрофореза в крахмальном и полиакриламидном гелях проанализированы 14 изоферментных систем, кодируемых 21 генетическим локусом (перечень локусов см. ниже). Детали экспериментального анализа и обозначения локусов изложены в наших предшествующих работах по гольцам [14, 25, 26]. Аллели обозначали соответственно электрофоретическим подвижностям кодируемых ими аллозимов, рассчитанным по отношению к подвижности продукта наиболее частого аллеля, принятой за 100. Частота нулевого аллеля вычислялась извлечением корня квадратного из доли в выборке гомозигот по нулевому аллелю (полное отсутствие активности). Частоты аллелей для изолюкусной пары *MDH-B1, 2** рассчитывали, исходя из равновероятного полиморфизма обоих локусов. Соответствие генотипических частот равновесию Харди–Вайнберга и гетерогенность аллельных частот в парах популяций и суммарно для всей группы исследованных популяций оценивали с помощью теста хи-квадрат в программе BIOSYS-2; в той же программе на основе хорд-дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса [23] получали дендрограмму популяций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микросателлиты

Основные показатели микросателлитной изменчивости в выборках из популяций кунджи, собранных в разных регионах ареала, представлены в табл. 3. Число аллелей по разным локусам колеблется в выборках от 1 до 22, а величина наблюдаемой гетерозиготности – от 0 до 0.833. Наибольший вклад в оценку средней гетерозиготности вносят локусы *Omy301* и *Smm5*. Наиболее полиморфными оказались выборки из популяций озер Итурупа и Кунашира и из реки Омокой о-ва Большой Шантар (средние H_o равны соответственно 0.410, 0.437, 0.445), наименее полиморфными – выборки из популяций р. Самарга и бассейна р. Камчатка (H_o равны соответственно 0.267 и 0.272). Уровень средней гетерозиготности по совокупности исследованных микросателлитных локусов у кунджи в среднем по популяциям – $H_o = 0.337$ и $H_e = 0.351$ – сходен с соответствующими оценками у близкого вида гольцов – мальмы *S. malma* [27, 28]. Статистически достоверные отклонения от равновесия Харди–Вайнберга по локусам, после корректировки уровня значимости по Бонферрони, составляют 3.8% от общего

числа тестов. Отклонения связаны в большинстве случаев с дефицитом гетерозигот, реже имеет место избыток гетерозигот. В выборке 6 (оз. Лисье) дефицит гетерозигот почти по всем локусам сопровождается относительно высокими оценками частоты предполагаемых “нулевых” аллелей (определенными методом максимального правдоподобия в программе Genpop 4.07). Вероятно, это обусловлено случайными причинами из-за малого размера выборки (8 особей). Можно отметить, что предполагаемые нулевые аллели по локусам *Omy301*, *Smm21*, *Ssa197* программа выявляет еще в 5 разных выборках, но только по локусу *Ssa197* такого рода аллели обнаруживаются сразу в четырех выборках. Мы проверили, используя рекомендации и программу [29], влияние предполагаемых нулевых аллелей на оценки генетической дифференциации F_{ST} . Оказалось, что с их учетом оценки F_{ST} среди проанализированных выборок изменяются незначительно – на 2–2.5%.

Значимые тесты на генотипическое неравновесие по сцеплению, с учетом поправки на множественные тесты, составили 3% от общего числа тестов, что не превышает порога вероятности их случайного появления.

Генетическая гетерогенность всей совокупности выборок хорошо выражена: *G*-тест (метод Фишера) высокодостоверен по каждому локусу и по всем локусам суммарно ($P = 0.0000$). Парные оценки межвыборочной дифференциации в F_{ST} и R_{ST} и их статистической значимости представлены в табл. 4. Общие оценки дифференциации внутри всей совокупности выборок: $F_{ST} = 0.203$, а $R_{ST} = 0.202$. Наибольшим дифференцирующим эффектом обладают локусы *Smm5*, *Smm17*, *Ssa197*.

Представление о генетических взаимоотношениях между популяциями дает дендрограмма, построенная на основе хорд-дистанций Кавалли-Сфорца и Эдвардса [23] между популяциями (рис. 2). Бутстреп-оценки подтверждают статистическую значимость представленных связей большинства популяций. На дендрограмме можно видеть группировку “северных” популяций, т.е. популяций Хабаровского края (3–6), Камчатки (12, 13) и примыкающей к ним выборки из Ямского залива (северное Охотоморье, 11), и более рыхлую “южную” группу, включающую сахалинские (8–10, со слабой бутстреп-поддержкой), курильские (1, 2) и приморскую (7) популяции, причем последняя существенно обособлена от остальных. Отметим, что подразделение исследованных популяций на северную и южную группы не имеет существенной бутстреп-поддержки, но визуально на дендрограмме представляется очевидным. Нельзя также исключить, что приморская кунджа, представленная здесь только одной

Таблица 3. Основные показатели изменчивости 10 микросателлитных локусов в выборках *S. leucomaenis*

№ вы- бор- ки	Показатели	Локусы									
		<i>Omy301</i>	<i>Smm3</i>	<i>Smm5</i>	<i>Smm17</i>	<i>Smm21</i>	<i>Ssa197</i>	<i>Ssa20.19</i>	<i>One109</i>	<i>Sle6</i>	<i>Sle5</i>
1	A/A_e	7/5.11	3/1.16	4/1.80	5/2.85	1/1.00	2/2.00	1/1.00	7/3.81	4/2.12	8/2.2.91
	Min-max	66-80	116-122	84-98	113-123	113	114-120	87	96-156	85-93	102-130
	H_e	0.804	0.137	0.446	0.649	0.000	0.500	0.000	0.738	0.529	0.657
	H_o	0.766	0.104	0.417	0.646	0.000	0.333	0.000	0.813	0.396	0.625
2	A/A_e	6/3.17	3/1.37	4/1.32	6/2.65	1/1.00	2/1.86	2/1.09	7/2.06	2/1.99.	7/3.37
	Min-max	66-80	116-120	84-98	111-123	113	114-120	87-91	96-144	91-93	102-132
	H_e	0.684	0.269	0.243	0.623	0.000	0.263	0.080	0.516	0.499	0.703
	H_o	0.833	0.313	0.250	0.646	0.000	0.479	0.083	0.500	0.500	0.766
3	A/A_e	3/1.96	3/1.27	2/1.03	2/1.99	3/1.62	4/1.86	2/1.03	3/1.56	3/2.05	3/1.13
	Min-max	66-74	114-120	84-96	113-121	113-129	114-126	81-89	92-104	89-93	102-154
	H_e	0.490	0.211	0.029	0.498	0.382	0.462	0.029	0.366	0.513	0.112
	H_o	0.382	0.235	0.029	0.529	0.412	0.412	0.029	0.353	0.441	0.118
4	A/A_e	4/2.12	3/1.31	1/1.00	1/1.00	2/1.09	4/1.58	2./ 1.09	4/1.72	4/3.07	3./ 1.92
	Min-max	62-74	114-120	96	121	113-121	114-126	87-89	92-112	89-99	102-138
	H_e	0.528	0.234	0.000	0.000	0.083	0.367	0.083	0.420	0.674	0.480
	H_o	0.304	0.261	0.000	0.000	0.087	0.348	0.087	0.522	0.739	0.609
5	A/A_e	5/2.73	4/1.82	2/1.08	5/1.42	5/1.36	5/2.83	2/1.34	6/2.99	4/2.69	9./ 2.18
	Min-max	62-78	14-122	84-96	113-131	113-125	114-126	87-89	88-112	85-93	102-156
	H_e	0.634	0.450	0.071	0.295	0.267	0.647	0.252	0.665	0.629	0.541
	H_o	0.704	0.481	0.074	0.296	0.296	0.667	0.296	0.741	0.593	0.630
6	A/A_e	3/2.67	3/2.13	1/1.00	4/2.17	2/1.60	4/2.90	2/1.60	4/3.66	3/2.84	4/1.97
	Min-max	66-78	114-120	96	113-127	113-119	114-126	87-89	92-108	85-93	102-166
	H_e	0.625	0.531	0.000	0.539	0.375	0.656	0.375	0.727	0.648	0.492
	H_o	0.250	0.250	0.000	0.250	0.000	0.750	0.000	0.625	0.500	0.375
7	A/A_e	2/1.51	2/1.07	3/1.34	3/1.74	1/1.00	2/1.28	2/1.04	3/1.93	2/1.15	7/3.55
	Min-max	72-80	116-120	92-100	119-123	113	114-120	87-89	104-112	91-93	102-124
	H_e	0.337	0.069	0.254	0.427	0.000	0.219	0.035	0.482	0.133	0.718
	H_o	0.286	0.071	0.214	0.464	0.000	0.250	0.036	0.357	0.143	0.821
8	A/A_e	3/1.72.	3/1.85	3/1.69	5/1.56	2/1.35	2/1.56	1/1.00	5/3.85	2/1.28	5/3.95
	Min-max	66-72	116-122	80-96	111-123	113-115	114-120	87	96-132	91-93	102-122
	H_e	0.419	0.458	0.407	0.355	0.259	0.361	0.000	0.740	0.219	0.747
	H_o	0.500	0.361	0.526	0.333	0.250	0.306	0.000	0.778	0.194	0.639
9	A/A_e	4/2.03	3/1.14	1/1.00	5/2.32	3/1.58	4/2.45	2/1.03	9/1.91	3/1.68	6/2.21
	Min-max	66-78	116-124	96	113-123	113-121	114-122	87-89	92-148	89-93	102-124
	H_e	0.508	0.122	0.000	0.569	0.365	0.592	0.032	0.476	0.406	0.545
	H_o	0.548	0.129	0.000	0.581	0.267	0.774	0.032	0.419	0.258	0.379
10	A/A_e	4/2.22	2/1.34	4/1.28	3/2.01	2/1.26	3/1.68	2/1.06	2/1.21	2/1.71	2/1.06
	Min-max	66-74	116-120	84-98	113-121	113-115	114-120	87-89	104-108	91-93	102-110
	H_e	0.548	0.251	0.216	0.503	0.208	0.403	0.057	0.170	0.415	0.057
	H_o	0.706	0.294	0.235	0.294	0.235	0.176	0.059	0.188	0.471	0.059
11	A/A_e	3/1.89	1/1.00	1/1.00	4/1.21	2/1.21	3/2.74	1/1.00	5/2.34	2/1.60	5/3.26
	Min-max	66-74	116	96	113-121	113-115	114-120	87	96-116	91-93	102-124
	H_e	0.471	0.000	0.000	0.176	0.170	0.635	0.000	0.572	0.375	0.693
	H_o	0.438	0.000	0.000	0.125	0.188	0.625	0.000	0.625	0.500	0.813
12	A/A_e	2/1.90	1/1.00	1/1.00	1/1.00	2/1.13	3/2.83	1/1.00	3/2.09	2/1.90	4/1.94
	Min-max	66-72	116	96	121	113-115	114-120	87	96-108	91-93	102-122
	H_e	0.472	0.000	0.000	0.000	0.111	0.646	0.000	0.520	0.484	0.488
	H_o	0.765	0.000	0.000	0.000	0.118	0.813	0.000	0.500	0.824	0.313
13	A/A_e	3/1.27	2/1.13	1/1.00	1/1.00	2/1.97	3/2.42	1/1.00	3/1.87	2/1.94	3/1.82
	Min-max	66-74	116-120	96	121	113-115	114-120	87	96-108	91-93	102-120
	H_e	0.215	0.111	0.000	0.000	0.491	0.586	0.000	0.464	0.484	0.451
	H_o	0.235	0.000	0.000	0.000	0.600	0.313	0.000	0.333	0.353	0.532

Примечание. A – число аллелей в локусе; A_e – эффективное число аллелей в локусе; min-max – диапазон размера аллелей; H_e – ожидаемая и H_o – наблюдаемая гетерозиготность. Жирным шрифтом выделены статистически значимые отклонения от равновесия Харди-Вайнберга (после коррекции уровня значимости по Бонферрони).

Таблица 4. Матрицы оценок попарной генетической дифференциации по микросателлитным локусам между выборками кунджи в величинах F_{ST} (выше диагонали) и R_{ST} (ниже диагонали)

Выборки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		0.0499	0.1930	0.1396	0.1004	0.1353	0.3136	0.1284	0.0925	0.1169	0.0987	0.1274	0.2208
2	0.0543		0.1859	0.1653	0.1119	0.1699	0.3097	0.1212	0.0599	0.0674	0.0913	0.1620	0.2645
3	0.2176	0.1271		0.2237	0.1212	0.1469	0.5023	0.2855	0.1111	0.1498	0.1285	0.2200	0.2062
4	0.2197	0.1576	0.1533		0.1158	0.1864	0.4858	0.2660	0.1244	0.2025	0.1207	0.1495	0.2140
5	0.1221	0.0813	0.1472	0.0423		0.0195	0.4361	0.1726	0.0829	0.1142	0.0690	0.1217	0.1546
6	0.1625	0.1612	0.2489	0.0566	-0.0265		0.4751	0.2387	0.1418	0.2021	0.1370	0.1539	0.1403
7	0.3927	0.5080	0.6714	0.5458	0.2349	0.1434		0.4235	0.4360	0.4749	0.4836	0.4999	0.5626
8	0.0639	0.0919	0.2490	0.1945	0.0484	0.0894	0.4501		0.1449	0.1773	0.1310	0.2136	0.3066
9	0.0941	0.0385	0.0556	0.0842	0.0758	0.1197	0.4741	0.0936		0.0340	0.0172	0.1433	0.1906
10	0.2106	0.1293	0.0477	0.1821	0.1340	0.2060	0.7632	0.2670	0.0583		0.1022	0.2250	0.3074
11	0.1345	0.0872	0.1728	0.0749	0.0141	0.0233	0.5166	0.0748	0.0220	0.2417		0.1127	0.1668
12	0.2911	0.2289	0.1996	0.0359	0.0538	0.0617	0.6519	0.2668	0.1415	0.2449	0.1524		0.0798
13	0.3573	0.3104	0.2419	0.082	0.0879	0.0945	0.6966	0.3318	0.1851	0.3189	0.2195	-0.0127	

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически незначимые оценки.

Таблица 5. Иерархический анализ генетического разнообразия популяций кунджи по микросателлитным локусам

Исследуемая группа	Число выборок	Генетическое разнообразие		
		H_T	H_S	$G_{ST} (\approx F_{ST}), \%$
Все выборки	13	0.4482	0.3509 (78.3%)	21.7*
Северная группа популяций	7	0.4015	0.3428 (85.4%)	14.6*
Южная группа популяций	6	0.4423	0.3603 (81.5%)	18.5*
Между северной и южной группами				5.4*
Между регионами в группах				9.7*
Между выборками в регионах				6.6*

Примечание. H_T – общее, H_S – внутривидовое, G_{ST} – относительное межвидовое разнообразие, по Ней [24]. * Статистически значимо при $P < 0.01$.

выборкой, может составлять самостоятельный кластер.

В пространстве главных координат (многомерное шкалирование) (рис. 3) отчетливо видна региональная дифференциация, а по оси 2 практически разделяются “северная” и “южная” группы охотоморского бассейна (исключая выборку 11). По оси 1 выборки из курильских популяций (1, 2) и сахалинской р. Виахту (8) несколько отделены от других выборок; вторая ось координат максимально разделяет выборку из р. Виахту и камчатские выборки (12, 13). Выборка из приморской р. Самарга (7) наиболее отдалена от остальных выборок по первой оси координат и особенно отличается от других популяций частотами аллелей в локусах *Smm5*, *Smm17*, *Ssa197*, *Sle5*, *Sle6*. Эти факты также могут свидетельствовать об определенной генетической самостоятельности приморской кунджи.

Иерархическое подразделение общей микросателлитной изменчивости (разнообразия) исследованных выборок (табл. 5) показывает, что 78.3% ее приходится на внутривидовую изменчивость; 5.4% составляет изменчивость между северной и южной группами популяций; 15.1% – между всеми регионами в целом (Курильские о-ва, Приморье, Сахалин, Хабаровский край, Ямский залив северного Охотоморья, Камчатка) и 9.7% – между регионами в группах; 6.6% – между выборками внутри регионов. Относительная величина внутривидового разнообразия составляет в северной группе 14.6%, в южной группе – 18.5%.

Изоляция расстоянием, т.е. корреляция оценок межвыборочной генетической дифференциации с соответствующими географическими расстояниями, определявшимися двумя способами (как расстояния между географическими координатами)

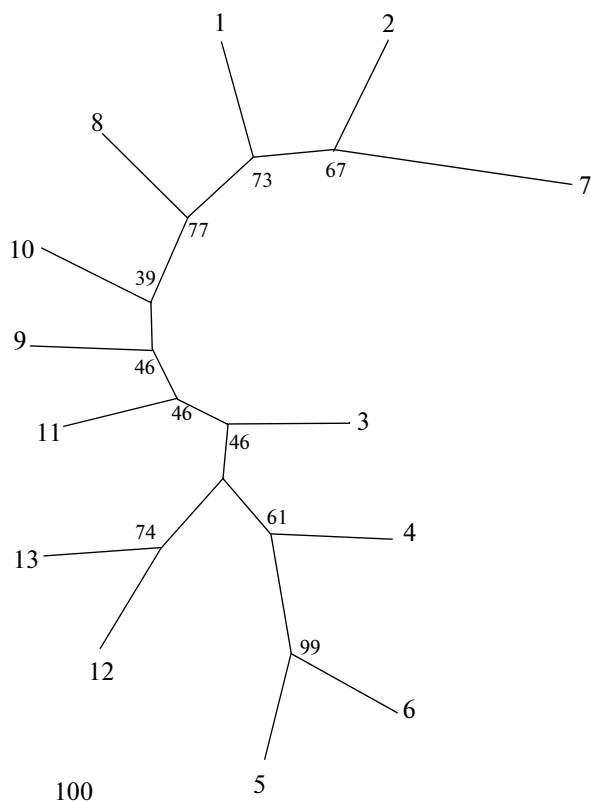


Рис. 2. Дендрограмма выборов из популяций кунджи, построенная методом Neighbor-joining на основании хордовых расстояний Кавалли-Сфорца по частотам аллелей 10 микросателлитных локусов (в программе Phylip 3.65). На концах ветвей – номера выборов (1–13, см. табл. 1). У основания ветвей – бутстреп-оценки в % от 1000 репликаций.

натами выборов и как расстояния по морю между выборками на карте), фактически не обнаруживается при использовании в анализе как коэффициента F_{ST} или отношения $F_{ST}/(1-F_{ST})$, так и R_{ST} . Применяемый в этом случае тест Мантеля (в программе GenPop) показывает статистическую незначимость такой корреляции при обоих способах определения географических расстояний. Но анализ изоляции расстоянием на межиндивидуальном уровне (на основе показателя F_{ST} , в программе GenAlEx) обнаруживает значимую корреляцию ($r = 0.253$, $P = 0.01$). Очевидно, что у кунджи, которая не способна к дальним морским миграциям (в отличие, например, от тихоокеанских лососей), практически нет обмена генами между географически отдаленными популяциями, и степень генетической дифференциации не связана с географическим расстоянием между ними. С другой стороны, экологическая структура ее популяций (не считая физически изолированных популяций), которые включают и жилые, и проходные формы, обеспечивает определенный уровень миграционного обмена генами между

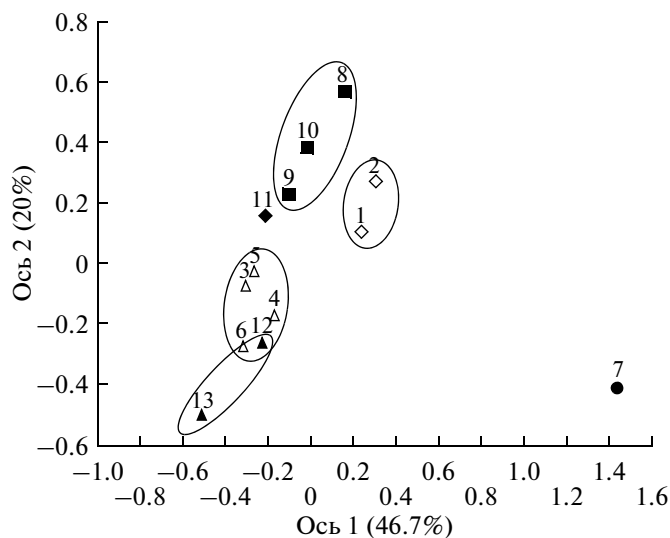


Рис. 3. Дифференциация выборов кунджи (1–13, см. табл. 1) в многомерном пространстве главных координат (Principal Coordinates Analysis в программе GenAlEx 6.2) на основании аллельной изменчивости 10 микросателлитных локусов. Овалами очерчены региональные группы выборов: 1, 2 – Курильские острова; 3–6 – Хабаровский край; 8–10 – Сахалин; 7 – р. Самарга, Приморье; 11 – Ямский залив, северное Охотоморье; 12, 13 – Камчатка.

географически близкими популяциями, в пределах определенных районов, например среди популяций северной части Хабаровского края.

Аллозимы

Электрофоретический анализ показал, что большая часть локусов (15 из 21) оказалась инвариантной во всех популяциях. К ним относятся $GPI-A^*$, $GPI-B1,2^*$, $IDHP-1^*$ и -2^* , $LDH-A1^*$, $-B1^*$, $-B2^*$, $MEP-3^*$, MPI^* , $PEP-D^*$, $PEP-B^*$, $FDHG^*$, $PGM-1^*$ и $EST-D^*$. Наиболее полиморфными во всех популяциях оказались изолюкусы $MDH-B1,2^*$, в некоторых популяциях – также локусы ACP^* и $PEP-LT^*$. Ожидаемая гетерозиготность с учетом 21 исследованного локуса в выборках насчитывает от 0.0291 (Долинка) до 0.0467 (Яма) (табл. 6). Наибольший вклад в гетерозиготность популяций вносят локусы $MDH-B1,2^*$ и ACP^* , имеющие высокие значения альтернативных аллелей во всех исследованных локальностях. Уровень аллозимной гетерозиготности у кунджи сопоставим (или выше) с таковым у близкого вида – мальмы [14, 15, 30]. Суммарный тест на гетерогенность по всем полиморфным локусам высокодостоверен ($P < 0.00001$). Доля межпопуляционной изменчивости в изученной группе составляет 8.8% (G_{ST} по Неи). Достоверные суммарные различия по частотам аллелей всех локусов найдены в сравнениях наиболее отдаленной северной популяции р. Ямы с каждой из осталь-

Таблица 6. Частоты аллелей полиморфных аллозимных локусов и средняя гетерозиготность по 21 исследованному локусу в популяциях кунджи

Полиморфные локусы	Аллели	Популяции рек					
		Яма	Белая	Долинка	Илюшина	Петровка	Звездная
<i>ACP*</i>	100	1.0000	0.9667	0.9333	0.8667	0.7200	0.8966
	72	0.0000	0.0333	0.0667	0.1333	0.2800	0.1034
<i>MDH-B1,2*</i>	100	0.4375	0.3667	0.4167	0.5333	0.3553	0.4052
	123	0.5625	0.6333	0.5833	0.4333	0.5658	0.5862
	80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0789	0.0000
	200	0.0000	0.0000	0.0000	0.0333	0.0000	0.0086
<i>PEP-LT*</i>	100	0.4226	0.9333	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	168	0.0000	0.0667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	0	0.5774	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>PGM-2*</i>	100	1.0000	1.0000	1.0000	0.9667	1.0000	0.9821
	90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0333	0.0000	0.0179
<i>SOD-2*</i>	100	1.0000	0.9333	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	115	0.0000	0.0667	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Средняя гетерозиготность по 21 исследованному локусу		0.0467	0.0370	0.0291	0.0392	0.0453	0.0339

ных, южных, популяций, а также между выборками из сахалинских рек (Белая, Долинка) и р. Петровка, Кунашир. Кластерный анализ (дендрограмма не приводится) отражает эти отношения среди выборок. Вполне очевидно, что генетические различия среди исследованных популяций по аллозимным локусам определяются географической изоляцией, что можно видеть и по микросателлитным маркерам на более представительном материале.

Факторы формирования популяционно-генетической структуры кунджи

В современный период пространственная дифференциация кунджи по аллозимам и микросателлитным локусам, в силу относительно невысоких численностей ее популяций, наличия жилой формы и ограниченной по протяженности миграции проходной формы, в значительной степени определяется влиянием дрейфа генов. Об этом свидетельствует более значительный уровень генетической дифференциации между географически отдаленными (чем между близкими) популяциями при отсутствии значимой корреляции генетических и географических расстояний между выборками из исследованной совокупности популяций, охватывающей почти весь ареал. Эффект изоляции расстоянием у кунджи, очевидно, существует среди группы популяций на меньшей пространственной шкале, где нет таких географических разрывов между анализируемыми популяциями, как в нашем материале в целом, и об этом свидетельствует обнаружение изоляции

расстоянием в анализе на межиндивидуальном уровне. Безусловно, генетическая дифференциация кунджи по микросателлитным локусам определяется также вкладом мутационного процесса, высокая скорость которого характерна для микросателлитной ДНК.

Значительную роль в формировании наблюдаемой популяционно-генетической структуры кунджи сыграли и исторические процессы преобразования ее ареала, связанные с периодами оледенения и межледниковья и с соответствующими изменениями уровня океана и температуры среды. Согласно существующим представлениям об эволюционных отношениях в роде *Salvelinus* на основе анализа аллозимов [12, 26] и мтДНК [31], вид кунджи сформировался раньше, чем более молодая группа гольцов, представленная такими видами, как мальма, голец Таранца, арктический голец. Исходя из митохондриальных данных, предполагается, что дивергенция линий кунджи и мальмы произошла на границе миоцена и плиоцена, когда вследствие падения уровня океана Японское, Охотское и Берингово моря были почти отрезаны от Тихого океана, и в образовавшихся рефугиях происходил процесс видообразования гольцов [31]. Вероятно, вид кунджи мог сформироваться в изолированном Японском море, так как несколько морфологически разнообразных популяций (форм), как уже упоминалось, обитают в настоящее время на Хоккайдо и Хонсю [6, 7]. Они, по-видимому, представляют собой потомков наиболее древних популяций кунджи. В то же время, как показывает анализ простран-

ственного распределения гаплотипов мтДНК у кунджи Японии [7], в ее современных популяциях наблюдается перекрытие нескольких митохондриальных линий, что трактуется как следствие неоднократных гидрографических и климатических изменений ареала, приводивших к изоляции отдельных популяций в рефугиях в ледниковые периоды и к расселению и вторичным контактам популяций в периоды межледниковья. Вероятно, под воздействием сходных событий формировались и популяции кунджи Курильских островов, Сахалина и Приморья. Отсюда в дальнейшем (предположительно уже в поздне- и постплейстоценовую эпохи) шло расселение кунджи в более северные регионы — в реки северной материковой части охотоморского бассейна и реки западной и восточной Камчатки — по мере возникновения в них соответствующих условий для колонизации и стабильного существования. Таким образом, в эволюционном плане северные популяции являются более молодыми, чем южные. Очевидно, что для более основательного доказательства этого предположения необходимы более подробные популяционно-генетические данные по ареалу кунджи, в том числе о ее мтДНК. Тем не менее стоит отметить, что меньшее генетическое разнообразие и меньшая пространственная дифференциация северных популяций дальневосточного региона, по сравнению с южными (вследствие более молодого эволюционного возраста первых соответственно истории развития ареала), прослеживаются не только у кунджи. Например, у гольца мальмы *Salvelinus malma*, по данным различных генетических исследований [15, 26, 31], уровень внутри- и межпопуляционного генетического разнообразия выше у южного подвида в сравнении с северным. У тихоокеанского лосося кеты *Oncorhynchus keta* генетическая дифференциация популяций в южных регионах азиатской части ареала также существенно выше, чем в северных [32, 33].

Таким образом, популяционно-генетическая структура кунджи сформировалась в основном в результате исторических геолого-климатических преобразований ее ареала (дальневосточного региона) и под воздействием генетического дрейфа в связи с относительно невысокой популяционной численностью и относительно слабой миграционной активностью ее проходной формы.

Авторы выражают благодарность И.Н. Рязановой (ИБМ ДВО РАН), Н.И. Крупянко (ТИНРО-центр), С.Ф. Золотухину (ХОТИНРО), М.Ю. Засыпкину (ИБПС ДВО РАН) и сотруднику Сахалинрыбвода А.Н. Власову за сбор материала из популяций кунджи в период полевых сезонов 2009–2011 годов; В.Д. Прохоровской (ИОГен РАН) за помощь в выделении ДНК из образцов кунджи; Ю.С. Белоконю (ИОГен РАН) за техническую помощь.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 10-04-00866 и Программы фундаментальных исследований РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития” (подпрограмма “Динамика и сохранение генофондов”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас пресноводных рыб России / Ред. Решетников Ю.С. Т. 1. М.: Наука, 2002. 379 с.
2. Лундберг Г.У., Легеза М.И. Рыбы Японского моря и сопредельных частей Охотского и Желтого морей. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1965. Т. 2. 391 с.
3. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1948. Ч. 1. 466 с.
4. McPhail J.D., Lindsey C.C. Freshwater fishes of northwestern Canada and Alaska // Fish. Res. Bd. Canada. 1973. Bull. 173. 381 p.
5. Scott W.B., Crossman E.J. Freshwater fishes of Canada // Fish. Res. Bd. Canada. 1973. Bull. 184. 966 p.
6. Catalog of fishes. Introductory material. Species of fishes (A-L) / Ed. Eschmeyer W.N. San Francisco: Publ. California Acad. Sciences, 1998. 958 p.
7. Yamamoto S., Morita K., Kitano S. et al. Phylogeography of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) inferred from mitochondrial DNA sequences // Zool. Sci. 2004. V. 21. P. 229–240.
8. Иванков В.Н., Броневский А.М. Постларвальная неоптениция у рыб // Зоол. журн. 1978. Т. 57. № 1. С. 87–93.
9. Черешнев И.А. Биологическое разнообразие пресноводной ихтиофауны Северо-Востока России. Владивосток: Дальнаука, 1996. 197 с.
10. Fujio Y., Tsuyuki H., Sasaki N. Loss duplicated gene expression in Japanese char, *Salvelinus pluvius* // Tohoku J. Agricult. Res. 1985. V. 36. № 1. P.35–47.
11. Goto A., Takahashi M., Yamazaki F. White-spotted and red-spotted morphs as a phenotypic variation of the Japanese charr *Salvelinus leucomaenis* in the rivers of southern Hokkaido, Japan // Physiol. Ecol. Jap. Spec. 1989. V. 1. p. 421–428.
12. Crane P.A., Seeb L.W., Seeb J.E. Genetic relationships among *Salvelinus* species inferred from allozyme data // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1994. V. 51 (Suppl. 1). P. 182–197.
13. Macaranas J.M., Nakajima M., Fujio Y. Genetic differentiation among cultured populations of Japanese char // Tohoku J. Agricult. Res. 1985. V. 36. № 2. p. 117–125.
14. Омельченко В.Т., Политов Д.В., Салменкова Е.А. и др. Генетическая дифференциация симпатричных гольцов рода *Salvelinus* р. Яма // Генетика. 1996. Т. 32. № 11. С. 1562–1568.
15. Осинев А.Г., Павлов С.Д. Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция популяций арктического гольца и мальмы (*Salvelinus alpinus*–*S. malma* complex) // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38. № 1. С. 47–61.
16. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2003. 431 с.
17. Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Шайхаев Е.Г., Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость

- кунджи *Salvelinus leucomaenis* // Генетика. 2013. Т. 49. № 9. С. 1088–1092.
18. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. P. 288–295.
 19. Rousset F. 2007. GENEPOP (version 4): Available from <http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>.
 20. Weir B. S., Cockerham C.C. Estimating F-statistic for the analysis of population structure // Evolution. 1984. V. 38. P. 117–125.
 21. Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies // Genetics. 1995. V. 139. P. 1463–1439.
 22. Goodman S.J. RST CALC: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance // Mol. Ecol. 1997. V. 6. P. 881–885.
 23. Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures // Evolution. 1967. V. 32. P. 550–570.
 24. Nei M. Molecular evolutionary genetics. N. Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
 25. 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.
 26. Salmenkova E.A., Omelchenko V.T., Kolesnikov A.A., Malinina T.V. Genetic differentiation of charrs in the Russian north and far east // J. Fish Biol. 2000. V. 57. (Suppl. A). P. 136–157.
 27. Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Радченко О.А. и др. Генетическая дивергенция гольцов рода *Salvelinus* Кроноцкого озера (полуостров Камчатка) // Генетика. 2005. Т. 41. № 8. С. 1096–1107.
 28. Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Афанасьев К.И. и др. Генетическая дивергенция популяций белого гольца *Salvelinus albus*, северной и южной форм мальмы *S. malma* (Salmonidae) // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49. № 6. С. 752–762.
 29. Chapuis M.P., Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // Mol. Biol. Evol. 2002. V. 24. P. 621–631.
 30. Everett R.I., Wilmot R.I., Kruger C.C. Population genetic structure of Dolly Varden from Beafort sea drainages of northern Alaska and Canada // Amer. Fish. Soc. Sympos. 1997. V. 19. P. 240–249.
 31. Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Brykov V.A. Divergence of the *Salvelinus* species mitochondrial DNA from northeastern Asia // Ecol. Freshwat. Fish. 2007. V. 16. P. 87–98.
 32. Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Алтухов Ю.П. Генногеографическое исследование популяций кеты, *Oncorhynchus keta* (Walbaum), в азиатской части видового ареала // Генетика. 1992. Т. 28. № 1. С. 76–91.
 33. Афанасьев К.И., Рубцова Г.А., Шумова М.В., Малинина Т.В. Популяционная структура кеты *Oncorhynchus keta* российского Дальнего Востока, выявленная по микросателлитным маркерам // Биол. моря. 2011. Т. 37. № 1. С. 39–47.

Population Genetic Differentiation of White-Spotted Char *Salvelinus leucomaenis* (Pallas) of Russian Far East

E. A. Salmenkova^a, V. T. Omelchenko^b, G. A. Rubtsova^a, K. I. Afanas'ev^a,
N. S. Romanov^b, and M. Yu. Kovalev^b

^a Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

e-mail: salm@vigg.ru

^b Zhirmunskii Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

The genetic structure of the populations in white-spotted char *Salvelinus leucomaenis* (family Salmonidae) was determined based on variations in ten microsatellite DNA loci in samples from different parts of the species range in the Russian Far East. In a number of samples, variations in 21 allozyme loci were examined, of which five loci were found to be polymorphic. The overall diversity level in the examined markers was comparable to that observed in a closely related char species, Dolly Varden. The estimates of interpopulation genetic differentiation were highly statistically significant in most of the pairwise comparisons among the samples. The overall evaluation of the spatial genetic differentiation in white-spotted char constituted $F_{ST} = 0.203$ and $R_{ST} = 0.202$. Cluster analysis and multidimensional scaling based on microsatellite allele frequencies indicated the possible subdivision of the examined samples into two main groups, i.e., northern (represented by the regions of the north of Khabarovsk krai, Kamchatka, Yama Bay) and southern (with regions including Sakhalin, Primorye, and the Kuril Islands). The allozyme data demonstrated a similar pattern of differentiation. The level of intra- and interpopulation genetic diversity in the southern group was higher than in the northern group. The isolation-by-distance test did not identify a significant correlation between genetic and geographic distances among the samples. The data obtained enabled the suggestion that the genetic structure of the population of white-spotted char was shaped by the influence of historical geological climatic rearrangements of its range and the genetic drift, because of determined by relatively low population number and limited in the extent of the migration activity of its anadromous form.