

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЕВРОПЕЙСКОГО ХАРИУСА (*THYMALLUS THYMALLUS* L.) ИЗ РЕК ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ АРЕАЛА (БАССЕЙНЫ БАРЕНЦЕВА И БЕЛОГО МОРЕЙ)

С. Ф. ТИТОВ¹, И. И. СТУДЕНОВ²

¹ГосНИОРХ, Санкт-Петербург, Россия

²СевПИНРО, Архангельск, Россия

На основе анализа 37 аллозимных локусов проведена оценка генетической изменчивости и степени дифференциации популяций европейского хариуса из восточной части ареала (бассейны Баренцева и Белого морей). Генетические различия ($D_N=0,001-0,002$) обнаружены даже между хариусами, обитающими в разных нерестовых притоках в пределах одной речной системы. Наиболее дифференцированы от остальных оказались популяции из рек Печоры и Индиги – водоемов, наиболее близких к Уральскому водоразделу. На основании величины выявленных различий ($D_N=0,035$) и особенностей распределения изменчивости по отдельным аллозимным локусам рассматривается правомочность выделения хариусов, обитающих в водоемах Уральского региона, в качестве самостоятельной генетической линии, обособленной в течение продолжительного периода времени. Обсуждаются возможные источники постледниковой реколонизации хариусом водоемов северной части Европы.

S. F. TITOV, I. I. STUDYONOV. GENETIC DIFFERENTIATION OF THE EUROPEAN GRAYLING (*Thymallus thymallus* L.) FROM RIVERS IN THE EASTERN PART OF THE DISTRIBUTION RANGE (BARENTS AND WHITE SEA WATERSHEDS)

Genetic variability and the degree of divergence between grayling populations from the east of the distribution range (Barents and White Sea watersheds) were evaluated relying on the analysis of 37 allozyme loci. Genetic differences ($D_N=0.001-0.002$) were found even between grayling stocks inhabiting different spawning tributaries within the same river systems. The greatest divergence from the rest was demonstrated by the populations from rivers Pechora and Indiga – the watercourses closest to the Ural drainage divide. The magnitude of the differences revealed ($D_N=0.035$) and the distribution of the variation among specific allozyme loci are considered to assess the validity of distinguishing the grayling inhabiting the Ural region waters as an independent, long-established genetic lineage. The likely sources for postglacial recolonization of northern Europe by grayling are discussed.

Введение

Европейский хариус распространен на обширной территории – от Франции и Британии

на западе до Урала на востоке и от Югославии и Италии на юге до Норвегии и Финляндии на севере (Persat et al., 1978). Очевидно, что этот вид не является редким для Европы. Однако, в

последние десятилетия, в связи с переломом и ухудшением экологической ситуации, многие популяции европейского хариуса оказались под угрозой исчезновения. Во многих странах Западной Европы – Франции, Германии, Австрии, Словакии – этот вид внесен в список «исчезающих» и взят под особую охрану (Lelek, 1984; Persat, 1996; Bertok, Budihna, 1999; Uiblein et al., 2001). Для поддержания численности популяций в некоторых странах практикуются выпуски в реки молоди хариуса, выращенной на рыбноводных хозяйствах (Sušnik et al., 2001). Необходимо учесть, что зачастую в реки выпускается молодь хариуса из других водоемов. Это, вероятно, оказывает на популяции негативное влияние, выражающееся в нарушении природной, эволюционно сложившейся популяционной структуры вида. Имеются также данные о малой эффективности таких выпусков (Persat, 1996), что объясняется высокой адаптивной приспособленностью природных популяций к локальным условиям того или иного водоема и высокой степенью изолированности локальных популяций.

Очевидно, что для сохранения видового разнообразия европейского хариуса должна быть разработана эффективная стратегия охраны наиболее важных линий (групп популяций) этого вида. Общеизвестно, что при проведении охранных мероприятий приоритет должен быть отдан популяциям или группам популяций, вносящим наибольший вклад в биологическое, в том числе и генетическое, разнообразие вида. В настоящее время такие популяции называются эволюционно важными единицами (evolutionary significant units, ESU) (Fraser, Bernatchez, 2001). В последнее время для выделения таких единиц все чаще используются генетические методы. Использование таких методов как анализ ДНК или аллозимный анализ позволяет оценить степень генетической дифференциации популяций и определить линии (группы популяций), вносящие основной вклад в генетическое разнообразие всего вида. До конца 90-х годов прошлого столетия популяционно-генетические исследования хариуса носили эпизодический характер и ограничивались анализом аллозимной изменчивости хариуса на ограниченных участках ареала (Koskiniemi, Kilpinen, 1987; Bouvet et al., 1990; Persat, Eppe, 1997) или изучением изменчивости по отдельным аллозимным локусам (Груздев, 1976; Шубин, 1979; Груздев, Сидоров, 1983; Ермоленко и др., 1987; Шубин и др., 2000; Ring et al., 1994). Появление и развитие методов изу-

чения изменчивости митохондриальной и ядерной ДНК позволило получить значительно больший объем информации о степени генетической подразделенности вида. В результате исследований с использованием микросателлитного анализа и анализа mtДНК были описаны основные филогенетические линии европейского хариуса и предложены сценарии последникового расселения этого вида в пределах современного ареала (Koskinen et al., 2000, 2002; Sušnik et al., 2001; Weiss et al., 2002).

По мнению зарубежных авторов на юге ареала обитает более древняя форма европейского хариуса, представленная, как минимум, двумя различными эволюционными линиями, относящимися к системе реки Дунай (бассейн Черного моря) и рекам Адриатики (Gross et al., 2001; Weiss et al., 2002). Рассматривается вопрос о выделении Адриатического хариуса в самостоятельный видовой таксон (Sušnik et al., 2001).

Северная часть ареала вида была освоена европейским хариусом в относительно недалеком прошлом, в последниковый период. Экспансия хариуса происходила из 2-х независимых рефугиумов. По данным Коскинена с соавторами (Koskinen et al., 2000) Швеция, южная и средняя части Норвегии, а также Польша и Дания были заселены хариусом из рефугиума, располагавшегося в центральной части Европы. Финляндия, Эстония, весь Северо-Запад России и Архангельский регион, по мнению этих же авторов, были реколонизированы европейским хариусом из восточного рефугиума, располагавшегося в районе Урала. Предложенный сценарий хорошо согласуется с имеющимися геологическими данными (Квасов, 1975) и данными по расселению других видов рыб (Osinov, Bernatchez, 1996; Nesbó et al., 1999; Englbrecht et al., 2000; Weiss et al., 2001).

Следует отметить, что в работе Коскинена с соавторами использовано ограниченное количество популяций из рек Российской части ареала, а район гипотетического восточного рефугиума представлен единственной выборкой из бассейна Северной Двины. Таким образом, следует констатировать, что к настоящему времени значительная часть ареала вида (от Карелии до Урала) оказалась неохваченной популяционно-генетическими исследованиями. В задачи настоящей работы входило:

- изучение генетической (аллозимной) изменчивости европейского хариуса из восточной части ареала (реки Баренцева и Белого морей);
- оценка степени генетической дифференциации изученных популяций хариуса и выде-

ление основных эволюционно значимых линий (ESU) хариуса в восточной части ареала (в целях сохранения генетического разнообразия вида).

Материал и методика

13 выборок европейского хариуса из восточной части ареала (бассейны Баренцева и Белого морей) были собраны в период 1998-2004 гг. (рис. 1, табл. 1). Рыбы были отловлены с использованием мелкоячеистого невода, электролова и спиннинга. Объем выборок колебался от 20 до 80 экземпляров; всего было проанализировано 626 рыб.

После проведения биологического анализа (измерение, взвешивание, определение пола) от каждой из рыб были взяты пробы тканей печени, белых скелетных мышц, глаза и сыворотки крови. Образцы тканей замораживали в жидком азоте и транспортировали в таком виде в лабораторию. Далее пробы хранили до проведения анализа не более одного месяца при температуре -20°C .

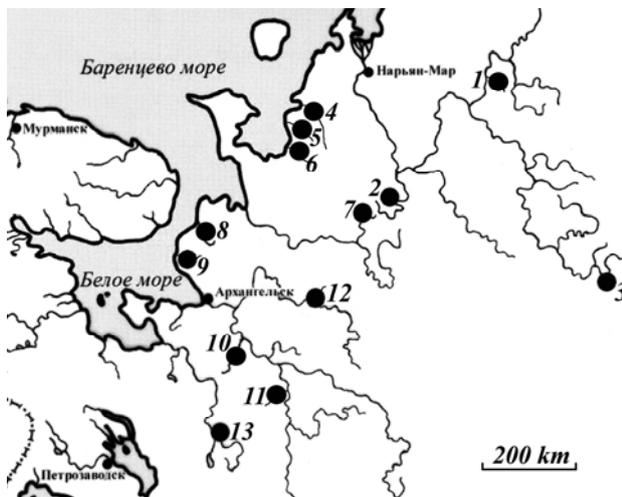


Рис. 1. Места сбора выборок европейского хариуса (*Thymallus thymallus* L.)

1. р. Сыня (бассейн р. Печоры); 2. р. Пижма (бассейн р. Печоры); 3. р. Унья (бассейн р. Печоры); 4. р. Индига; 5. р. Великая; 6. р. Волонга; 7. р. Пижма (бассейн р. Мезени); 8. р. Мегра; 9. р. Зимняя Золотица; 10. р. Емца (бассейн р. Северной Двины); 11. р. Ледь (бассейн р. Северной Двины); 12. р. Явзора (бассейн р. Северной Двины); 13. р. Кена (бассейн р. Онеги)

Таблица 1. Характеристика выборок европейского хариуса, проанализированных в настоящем исследовании

Речная система; популяция	Объем выборки, экз.	Годы сбора
Печора, р. Унья	49	2000
Печора, р. Сыня	50	2001
Печора, р. Пижма	50	2000
р. Индига	80	2003
р. Великая	50	2003
р. Волонга	50	2002
Мезень, р. Пижма	50	2000
р. Мегра	50	2004
р. Зимняя Золотица	52	2001
Северная Двина, р. Емца	50	2001
Северная Двина, р. Ледь	25	2001
Северная Двина, р. Явзора	50	2000
Онега, р. Кена	20	1998

С использованием метода электрофореза белков в полиакриламидном геле было изучено 16 ферментов, кодируемых 37 локусами (табл. 2). При проведении электрофоретических разгонок были использованы 4 буферные системы: (А) – трис-ЭДТА-боратный буфер, pH 8,3 (Peacock et al., 1965); (В) – трис-цитратный гелевый буфер, pH 8,0/трис-боратный электродный буфер, pH 9,0 (Cross, Ward, 1965); (С) – трис-цитратный буфер, pH 7,1 (Shaw, Prasad, 1970); (D) – Трис-HCl гелевый буфер, pH 8,9/трис-глициновый электродный буфер, pH 8,3 (Davis, 1964).

Гели окрашивались с использованием стандартных методик (Корочкин и др., 1977; Aebersold et al., 1987). При обозначении ферментов и локусов использована номенклатура Шекли с соавт. (Shaklee et al., 1990).

Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета программ «BIOSYS-1» (Swofford, Selander, 1989) и его модифицированной версии «BIOSYS-2» (Black, 1997). Уровень генетической дифференциации между парами популяций подсчитан с использованием F-индексов (Wright, 1978). UPGMA дендрограмма была построена по невзвешенным оценкам стандартных генетических дистанций (Nei, 1978). Устойчивость положения популяций и их групп на UPGMA дендрограмме оценивали с помощью бутстреп анализа с использованием пакета программ PHYLIP (Felsenstein, 1997).

Таблица 2. Проанализированные ферменты, число исследованных локусов, их тканевая экспрессия и использованные буферные системы

Фермент	Е.С. No	Локус	Ткань	Буфер
Аспаратаминотрансфераза	2.6.1.1	<i>sAAT-1,2*</i>	М, Е	А
		<i>sAAT-3*</i>	Л	А
		<i>sAAT-4*</i>	Л	А
		<i>AAT-5*</i>	Е	А
Аконитат гидратаза (аконитаза)	4.2.1.3	<i>AH* (ACO*)</i>	Л	А
Креатинкиназа	2.7.3.2	<i>CK*</i>	М	А
Эстераза-D	3.1.-.-	<i>ESTD*</i>	М, Л	А
Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	1.1.1.8	<i>G3PDH*</i>	М	А
Глюкозо-6-фосфатизомераза	5.3.1.9	<i>GPI-A1,2*</i>	М, Л, Е	А, D
		<i>GPI-B1*</i>	М	А, D
		<i>GPI-B2*</i>	М	А, D
Л-идитолдегидрогеназа	1.1.1.14	<i>IDDH-1,2*</i>	Л	В
Изоцитратдегидрогеназа	1.1.1.42	<i>IDHP-1*</i>	М	С
		<i>IDHP-2*</i>	М	С
		<i>IDHP-3*</i>	Л	С
Лактатдегидрогеназа	1.1.1.27	<i>LDH-A*</i>	М	В
		<i>LDH-B1*</i>	Е	В
		<i>LDH-B2*</i>	Л, Е	В
		<i>LDH-C*</i>	Е	В
Малатдегидрогеназа	1.1.1.37	<i>sMDH-A1,2*</i>	Л, Е	А, D
		<i>sMDH-B1,2*</i>	М	А, D
НАДФ ⁺ -зависимый маликэнзим	1.1.1.40	<i>mMEP-1,2*</i>	М	А
		<i>sMEP-3*</i>	М	А
Манноза-6-фосфатизомераза	5.3.1.8	<i>MPI-1*</i>	Л	А
		<i>MPI-2*</i>	Л	А
Фосфоглюконатдегидрогеназа	1.1.1.44	<i>PGDH*</i>	М	А
Фосфоглюкомутаза	5.4.2.2	<i>PGM-1*</i>	М	А
		<i>PGM-2*</i>	М	А
Супероксиддисмутаза	1.15.1.1	<i>mSOD-1*</i>	М, Л	А
		<i>sSOD-2*</i>	М, Л	А
Трансферрин		<i>TF*</i>	С	Д, В

Примечание. Ткани: М=мышцы; Л=печень; Е=глаз; С=сыворотка крови.

Буферы: А=трис-ЭДТА-борат; В=трис-цитрат/трис-борат; С=трис-цитрат; D=Трис-Нсl/трис-глицин.

Результаты

Аллозимная изменчивость. Анализ аллозимной изменчивости у хариуса из восточной части ареала проведен по 37 генным локусам. Во всех проанализированных выборках следующие локусы оказались инвариантны: *sAAT-2**, *sAAT-3**, *ESTD**, *GPI-A1,2**, *GPI-B1**, *GPI-B2**, *IDDH-1**, *IDHP-1**, *IDHP-2**, *LDH-B2**, *sMDH-A1,2**, *sMDH-B1**, *mMEP-1,2**, *sMEP-3**, *MPI-1**, *PGDH**, *mSOD-1**, *sSOD-2**. Полиморфизм выявлен по 16 локусам (табл. 3); впервые описана изменчивость по восьми из них: *sAAT-1**, *sAAT-4**, *AAT-5**, *IDDH-2**, *IDHP-3**, *LDH-C**, *sMDH-B2** и *MPI-2**.

В большинстве полиморфных локусов обнаружено небольшое число (2–3) аллелей. Исключение составляют трансферрин *TF** (4 аллеля) и

печеночная изоцитратдегидрогеназа *IDHP-3** (6 аллелей; в данном исследовании – 5). Распределение генотипов по всем полиморфным локусам в исследованных выборках соответствует ожидаемому соотношению по Харди-Вайнбергу. Исключение составила выборка хариуса из р. Емцы, оказавшаяся статистически неравновесной по локусу *LDH-B1** ($p < 0,01$).

Поскольку полиморфные локусы *AAT-5**, *TF** и *AH** изучены не во всех выборках, они были исключены из дальнейшего статистического анализа. Степень внутривидового генетического разнообразия любого вида обычно оценивается по таким показателям как количество аллелей на локус (N_a), процент полиморфных локусов (P) и средний уровень гетерозиготности (H) (табл. 4).

Продолжение табл. 3.

Аллели		р. Печора/ Сыня	р. Печора/ Пижма	р. Печора/ Унья	р. Индига	р. Великая	р. Волонга	р. Мезень/ Пижма	р. Мерга	р. Зимняя Золотица	р. С. Двина/Емца	р. С. Двина/Ледь	р. С. Двина/ Явзора	р. Онега/Кожка
<i>LDH-A*</i>	A (190)	.000	.000	.000	.000	.060	.276	.380	.949	.769	.620	.600	.660	.550
	B (100)	1.000	1.000	1.000	1.000	.940	.724	.620	.051	.231	.380	.400	.340	.450
<i>LDH-B1*</i>	A (100)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.970	1.000	1.000	1.000
	B (72)	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.030	.000	.000	.000
<i>LDH-C*</i>	B (115)	.400	.266	.344	.273	.000	.082	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	C (100)	.600	.723	.656	.727	1.000	.918	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	D (83)	.000	.011	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>sMDH-B2*</i>	A (100)	.820	1.000	.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	B (85)	.120	.000	.010	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>MPI-2*</i>	A (116)	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.160	.106	.110	.000	.000	.000
	B (107)	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.060	.000	.000	.000	.000	.000
	C (100)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.780	.894	.890	1.000	1.000	1.000
<i>PGM-1*</i>	A (100)	1.000	1.000	.020	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	B (82)	.000	.000	.980	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
<i>PGM-2*</i>	A (100)	.720	.708	.640	.557	.580	.827	.418	.211	.000	.210	.340	.429	.400
	B (86)	.280	.292	.360	.443	.420	.173	.582	.789	1.000	.790	.660	.571	.600
<i>TF*</i>	A (100)		.050	.150	.100	.136		.980			1.000		1.000	1.000
	B (90)	N.D.	.000	.000	.300	.091	N.D.	.020	N.D.	N.D.	.000	N.D.	.000	.000
	C (81)		.930	.850	.600	.409		.000			.000		.000	.000
	D (70)		.020	.000	.000	.364		.000			.000		.000	.000
<i>N</i>		50	50	49	80	50	50	50	50	52	50	25	50	20

Примечание. N.D. = данные отсутствуют.

Уровень полиморфизма в изученных выборках варьирует в пределах от 8,6% (реки Чешской губы Баренцева моря) до 20% (р. Печора). Индекс среднего уровня гетерозиготности оказался наименьшим в реках Зимнего берега Белого моря – 3. Золотице и Мегре ($H=0,025$ и $0,031$ соответственно), а наибольшим – в нерестовых притоках бассейна р. Печоры – рр. Сыне и Унье ($H=0,062$ и $0,060$ соответственно).

Генетическая дифференциация исследованных популяций. Невзвешенные оценки стан-

дартных генетических дистанций (Nei, 1978), рассчитанные по 34 локусам для популяций хариуса восточной части ареала, находятся в диапазоне $D_N=0,001-0,035$ (табл. 5). Максимально дифференцированными от всех остальных оказались популяции хариуса из р. Индига и нерестовых притоков р. Печоры ($D_N=0,035$). На UPGMA дендрограмме (рис. 2), построенной по генетическим дистанциям, эти популяции составляют обособленный кластер.

Таблица 4. Показатели генетического разнообразия в исследованных выборках европейского хариуса (по 34 локусам)

Бассейн	Речная система	Популяции	Количество аллелей на локус	Процент полиморфных локусов*	Средняя гетерозиготность		
					наблюдаемая	ожидаемая	
Баренцево море	Печора	Сыня	$1,2 \pm 0,1$	17,1	$0,062 \pm 0,026$	$0,062 \pm 0,026$	
		Пижма	$1,2 \pm 0,1$	11,4	$0,049 \pm 0,024$	$0,051 \pm 0,024$	
		Унья	$1,3 \pm 0,1$	20,0	$0,060 \pm 0,027$	$0,059 \pm 0,027$	
		Индига	Индига	$1,1 \pm 0,0$	8,6	$0,036 \pm 0,021$	$0,036 \pm 0,020$
		Великая	Великая	$1,1 \pm 0,0$	8,6	$0,033 \pm 0,021$	$0,032 \pm 0,020$
		Волонга	Волонга	$1,1 \pm 0,1$	11,4	$0,037 \pm 0,019$	$0,038 \pm 0,020$
		Мезень	Пижма	$1,1 \pm 0,1$	11,4	$0,037 \pm 0,021$	$0,036 \pm 0,020$
Белое море	Мегра	Мегра	$1,1 \pm 0,1$	11,4	$0,031 \pm 0,017$	$0,031 \pm 0,016$	
		3. Золотица	3. Золотица	$1,1 \pm 0,1$	11,4	$0,025 \pm 0,014$	$0,027 \pm 0,016$
		Северная	Емца	$1,1 \pm 0,1$	14,3	$0,040 \pm 0,020$	$0,043 \pm 0,021$
		Двина	Ледь	$1,1 \pm 0,0$	8,6	$0,046 \pm 0,026$	$0,041 \pm 0,023$
		Онега	Явзора	$1,1 \pm 0,1$	11,4	$0,039 \pm 0,021$	$0,042 \pm 0,022$
			Кена	$1,1 \pm 0,1$	14,3	$0,037 \pm 0,020$	$0,039 \pm 0,021$

* *Примечание.* Локус считается полиморфным, если обнаружено более одного аллеля.

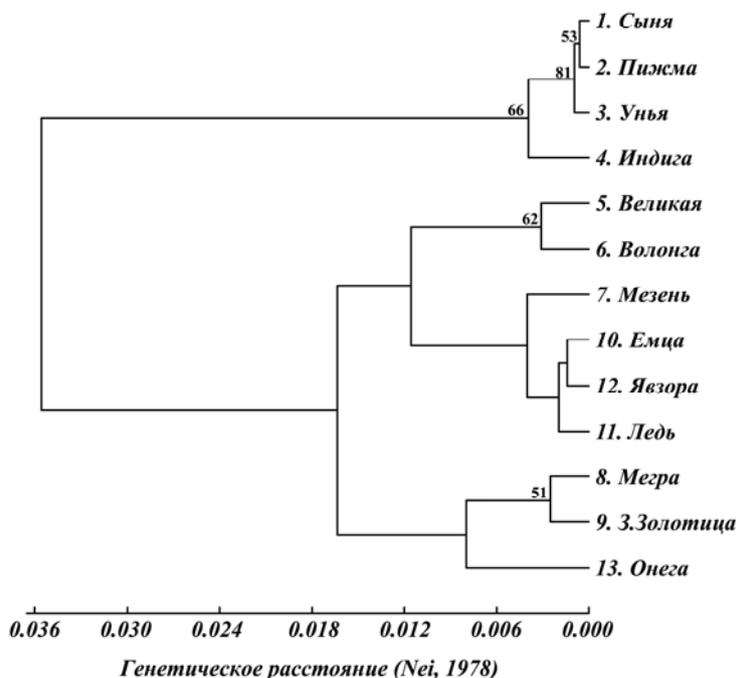


Рис. 2. UPGMA дендрограмма невзвешенных генетических расстояний (Nei, 1978) для исследованных популяций хариуса

Таблица 5. Величины невзвешенных генетических дистанций (Nei, 1978, ниже диагонали) и уровни индексов F_{ST} (Wright, 1978, выше диагонали), полученные при межпопуляционных сравнениях хариусов из рек бассейнов Белого и Баренцева морей

Популяция	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. р. Печора/Сыня	—	.014	.011	.045	.169	.174	.159	.415	.398	.239	.255	.216	.325
2. р. Печора/Пижда	.001	—	.010	.054	.185	.195	.172	.444	.427	.256	.274	.233	.346
3. р. Печора/Унья	.001	.001	—	.038	.175	.189	.158	.418	.396	.235	.255	.218	.331
4. р. Индига	.004	.004	.004	—	.144	.181	.114	.450	.420	.216	.247	.200	.357
5. р. Великая	.035	.035	.035	.035	—	.046	.096	.332	.306	.160	.123	.143	.174
6. р. Волонга	.035	.035	.035	.035	.003	—	.120	.285	.300	.170	.113	.122	.145
7. р. Мезень	.035	.035	.035	.035	.011	.011	—	.272	.234	.049	.079	.036	.216
8. р. Мегра	.035	.035	.035	.035	.016	.016	.016	—	.046	.129	.090	.154	.103
9. р. З. Золотица	.035	.035	.035	.035	.016	.016	.016	.003	—	.088	.071	.142	.116
10. р. Северная Двина/Емца	.035	.035	.035	.035	.011	.011	.004	.016	.016	—	.031	.021	.148
11. р. Северная Двина/Ледь	.035	.035	.035	.035	.011	.011	.004	.016	.016	.002	—	.030	.063
12. р. Северная Двина/Явзора	.035	.035	.035	.035	.011	.011	.004	.016	.016	.001	.002	—	.148
13. р. Онега/Кена	.035	.035	.035	.035	.016	.016	.016	.008	.008	.016	.016	.016	—

Альтернативный кластер образован оставшимися девятью популяциями, которые оказались разделены на 3 группы. Одну из них составили популяции хариуса из рек Зимнего берега Белого моря – Мегры и З. Золотицы – и реки Онеги ($D_N=0,003-0,008$). В пределах второй группы хариусы из нерестовых притоков р. Северной Двины оказались ассоциированы с хариусом из р. Мезень ($D_N=0,004$). Еще один кластер образован популяциями хариуса из рек Чешской губы Баренцева моря – Великой и Волонги ($D_N=0,003$). Бутстреп анализ показал, что высокую степень поддержки имеет объединение в единый кластер выборок хариуса из рек Печоры и Индиги. Относительно высокую поддержку имеет объединение пар выборок Великая–Волонга (Чешская губа Баренцева моря) и Мегра–Зимняя Золотица (Летний берег Белого моря) (62% и 51% соответственно). Бутстреп поддержка всех остальных точек ветвления на дендрограмме оказалась ниже 50%.

Как и следовало предполагать, наименее дифференцированными друг от друга оказались выборки хариусов, представляющих единую речную систему. Для трех популяций хариусов из бассейна р. С. Двины величина генетических дистанций составляла $D_N=0,001-0,002$, а для популяций из бассейна р. Печоры не превышала $D_N=0,001$. Однако даже между выборками в пределах этих кластеров нами не отмечено генетической гомогенности. Тест на однородность по частотам аллелей 7 полиморфных локусов выявил генетическую дифференциацию между выборками из бассейна р. Печоры по 3-м локусам (*G3PDH**, $p < 0,05$; *sMDH-B2**, $p < 0,001$; *PGM-1**, $p < 0,01$). По частотам аллелей 3-х из 5-ти локусов различаются между собой выборки хариуса из притоков бассейна р. С. Двины (*CK**, $p < 0,01$; *PGM-B2**, $p < 0,01$; *MPI-2**, $p < 0,001$).

При попарном сравнении исследованных популяций хариуса величины F_{st} колебались в значительных пределах – от 0,010 до 0,450

(табл. 5). Максимальные значения этого показателя отмечены при сравнении популяций из рек бассейна Баренцева моря – Печоры и Индиги – с хариусами из рек Зимнего берега Белого моря – Мегры и З. Золотицы ($F_{st}=0,396-0,450$). Наименьшие показатели получены при сопоставлении выборок хариусов, обитающих в разных нерестовых притоках единой речной системы Печоры ($F_{st}=0,010-0,014$).

Обсуждение

В результате настоящего исследования впервые получены данные об уровне генетической (аллозимной) изменчивости и степени генетической дифференциации европейского хариуса из восточной части ареала. Из проанализированных 37 генных локусов 16 оказались полиморфными. Впервые описана изменчивость по восьми локусам: *sAAT-1**, *sAAT-4**, *AAT-5**, *IDDH-2**, *IDHP-3**, *LDH-C**, *sMDH-B2** и *MPI-2**. Установлено, что в исследованных популяциях из рек Баренцева и Белого морей индекс уровня гетерозиготности изменяется в пределах $H=0,025-0,060$, составляя в среднем 0,041. Учитывая тот факт, что из анализа нами были исключены переменные локусы *AAT-5**, *TF** и *AH**, следует предположить, что рассчитанные показатели генетического разнообразия оказались даже несколько заниженными. Тем не менее, уровень гетерозиготности в изученных популяциях оказался существенно выше, чем в природных и заводских популяциях европейского хариуса из рек Франции (данные по Bouvet et al., 1990) и Финляндии (данные по Koskiniemi, Kilpinen, 1987), а также в популяциях другого представителя данного рода – сибирского хариуса *Thymallus arcticus* (Lynch, Vyse, 1979) (табл. 6). Это позволяет пересмотреть полученные ранее выводы о крайне низком уровне генетической изменчивости в популяциях европейского хариуса (Bouvet et al., 1990).

Таблица 6. Сравнение уровня гетерозиготности у представителей рода *Thymallus* (по данным разных авторов)

Вид	Количество популяций	Количество локусов	Уровень гетерозиготности (колебания)	Средний уровень гетерозиготности	Авторы (публикации)
<i>Thymallus arcticus</i>	4	36	0,000–0,054	0,034	Lynch, Vyse, 1979
<i>Thymallus thymallus</i>	9	34	0,000–0,054	0,021	Bouvet et al., 1990
<i>Thymallus thymallus</i>	20	26	0,013–0,049	0,032	Koskiniemi, Kilpinen, 1987
<i>Thymallus thymallus</i>	13	34	0,025–0,060	0,041	Настоящее исследование

Различия в уровне показателей генетического разнообразия, полученных в настоящем исследовании и в работах других авторов могут быть объяснены несколькими причинами. Применение иного метода электрофоретических разгонок (использование акриламидного геля вместо крахмального) и анализ дополнительных ферментных систем (локусов) могли привести к выявлению дополнительного генетического разнообразия. Другим объяснением может быть то, что изученные в настоящем исследовании выборки представляют часть ареала хариуса, которая в наименьшей степени затронута человеческой активностью. В исследованных водоемах никогда не проводились восстановительные выпуски заводской молоди. Таким образом, описанная нами генетическая изменчивость в полной мере отражает исходную (нативную), исторически сложившуюся генетическую структуру данного вида.

Самые высокие показатели генетического разнообразия – количество аллелей на locus (N_a), процент полиморфных локусов (P) и средний уровень гетерозиготности (H) – отмечены для хариусов, обитающих в бассейне р. Печоры. Этот факт невозможно объяснить с позиций популяционной генетики, если рассматривать хариуса р. Печоры как популяцию, обитающую на границе ареала вида, поскольку именно такие «краевые» популяции должны обладать обедненным генофондом. Однако если исходить из общепринятого (Schöfmann, 2000) предположения о том, что центром возникновения всего разнообразия семейства *Timallidae* является Монголия, то р. Печора представляет собой водоем, географически наиболее близкий к предполагаемым путям проникновения хариусов из Азии в Европу. В таком случае популяция хариуса р. Печоры должна быть наиболее близкой к «предковой» популяции европейского хариуса и обладать значительной частью ее генетического потенциала.

Проведенный анализ свидетельствует о высоком уровне генетической дифференциации хариуса из восточной части ареала. Существенная генетическая дифференциация отмечена даже между хариусами, населяющими различные нерестовые притоки одной речной системы. Статистически значимые различия по 3-м из 7-ми проанализированных полиморфных локусов ($D_N=0,001$) обнаружены между выборками хариуса из рек Пижма, Унья и Сыня, являющихся нерестовыми притоками р. Печоры. Не меньшие различия обнаружены при сравнении выборок из нерестовых притоков р. С. Двины –

рр. Леди, Явзоры и Емцы (статистически значимые различия по частотам аллелей 3-х из 5-ти полиморфных локусов; $D_N=0,001-0,002$). Полученные результаты полностью согласуются с особенностями биологии вида. Для хариуса, как молоди, так и взрослых особей, характерно отсутствие значительных миграций. Доказано, что даже в случае существования ограниченных миграций, когда нерест хариусов происходит в притоках, а нагул – в основном русле реки, существенную роль играет хоминг, т.е. возвращение производителей в родные реки (Павлов и др., 1998; Kristiansen, Doving, 1996). Такие особенности поведения приводят к ограниченному обмену мигрантами между локальными популяциями и накоплению генетических различий в результате генетического дрейфа. Следствием этого является значительная микрогеографическая изменчивость европейского хариуса в пределах одного водоема (Bouvet et al., 1990; Koskinen et al., 2001).

Значительно больший уровень дифференциации обнаружен между хариусами, населяющими различные речные системы. Исследованные нами популяции из рек Белого моря и Чешской губы Баренцева моря (рр. Великая и Волонга) сгруппировались на UPGMA дендрограмме в 3 кластера. Один из кластеров образуют популяции из рек Зимнего берега Белого моря и реки Онеги, второй кластер включает в себя хариусов из рек Северной Двины и Мезени. Третий кластер объединил хариусов из рек Чешской губы Баренцева моря. Несложно заметить, что все группы образованы популяциями из водоемов, географически наиболее близких друг к другу.

Наибольший интерес представляют хариусы, населяющие самые восточные из исследованных нами водоемов – рек Печоры и Индиги. Эта группировка оказалась наиболее дифференцированной от остальных изученных популяций (рис. 2). Причины такого высокого уровня различий ($D_N=0,035$) становятся очевидными при анализе локусов *sAAT-1**, *sAAT-4**, *CK**, *IDHP-3**, *LDH-A**, *LDH-C**, *PGM-2**, вносящих наибольший вклад в межпопуляционную генетическую изменчивость (табл. 7). Локусы *CK** и *LDH-A**, высоко полиморфные практически во всех популяциях европейского хариуса, оказались инвариантны у хариуса из рек Печоры и Индиги. Совершенно противоположная тенденция наблюдается по локусам *IDHP-3** и *LDH-C**. Эти локусы, проявляющие высокую степень изменчивости у хариуса из рек Печоры и Индиги, фиксированы по одному из аллелей во всех

других выборках. Локус печеночной аспартаминотрансферазы *sAAT-1**, полиморфный в выборках хариуса из нерестовых притоков р. Печоры, инвариантен во всех остальных выборках, за исключением хариуса из р. Онеги. Сходная тенденция в характере полиморфизма по всем перечисленным локусам сохраняется и при анализе генетической изменчивости европейского хариуса из рек западной части ареала (Koskiniemi, Kilpinen, 1987; Bouvet et al., 1990; Persat, Eppe, 1997).

Таблица 7. Тест на генетическую гомогенность (F-статистика) изученных популяций европейского хариуса

Локус	F(IS)	F(IT)	F(ST)
<i>sAAT-1*</i>	-.064	.157	.208
<i>sAAT-4*</i>	-.010	-.001	.009
<i>CK*</i>	-.048	.436	.461
<i>G3PDH*</i>	-.053	-.006	.044
<i>IDDH-2*</i>	-.010	-.001	.009
<i>IDHP-3*</i>	.081	.349	.292
<i>LDH-A*</i>	.033	.471	.453
<i>LDH-B1*</i>	.158	.184	.030
<i>LDH-C*</i>	-.071	.181	.235
<i>sMDH-B2*</i>	-.126	-.010	.103
<i>MPI-2*</i>	.019	.133	.116
<i>PGM-1*</i>	-.053	-.004	.046
<i>PGM-2*</i>	.030	.233	.209
Среднее	.003	.325	.323

Значительная часть выявленного межпопуляционного генетического разнообразия объясняется именно обособленностью «уральских» популяций: почти 20% генетического разнообразия приходится на различия между двумя основными кластерами (табл. 8).

Таблица 8. Распределение генного разнообразия (%) в исследованных выборках европейского хариуса

Уровни иерархии	Относительное генное разнообразие (%)
Между регионами	18,1
Между речными системами в пределах регионов	11,3
Между нерестовыми притоками в пределах речных систем	2,4
В пределах выборок	68,2

Есть основания предполагать, что между популяциями из водоемов, примыкающих к Уралу и популяциями из других частей ареала в течение продолжительного периода времени не происходило сколько-нибудь значительного

обмена генами. Это, в свою очередь, свидетельствует о давнем обособлении этих группировок европейского хариуса.

По предположению Коскинена с соавторами (Koskinen et al., 2000, 2002) постледниковая реколонизация северной части Европы европейским хариусом происходила независимо из двух самостоятельных рефугиумов. Из первого рефугиума, условно называемого «центральноевропейским», хариус заселил водоемы Норвегии (кроме северной части), Швеции, Дании, Польши и, частично, Германии. Вся остальная часть Скандинавии, Прибалтика и Европейская часть России была заселена хариусом из другого самостоятельного рефугиума, названного авторами «восточным» и располагавшегося в районе Урала, вероятно, севернее настоящего бассейна Каспия. Предложенная схема реколонизации Европы европейским хариусом оказывается очень сходной с гипотезами о постледниковом расселении других видов рыб, в частности, лосося (Nilsson et al., 2001), кумжи (Osinov, Bernatchez, 1996) и окуня (Nesbó et al., 1999).

Однако в самом исследовании Коскинена с соавторами восточная часть ареала представлена всего лишь одной выборкой хариуса из бассейна реки Северной Двины. Неохваченной исследованием оказалась как раз та часть современного ареала вида, на которой, по мнению авторов, и располагался предполагаемый «восточный» рефугиум.

Полученные нами данные неопровержимо свидетельствуют о том, что популяции, обитающие в настоящее время на территории предполагаемого «восточного» рефугиума, генетически дифференцированы от популяций из остальной части ареала вида. Большая величина этих различий ($D_N=0,035$) и характер распределения изменчивости по отдельным ферментным локусам (*IDHP-3**, *LDH-C**, *TF**) позволяют предположить, что обособление «уральской» группировки хариусов от других произошла в гораздо более ранний период времени, нежели последняя регрессия ледника. Имеющиеся геологические данные (Квасов, 1975) свидетельствуют о существовании в восточной части Европы нескольких приледниковых водоемов (озер), которые частично или полностью могли быть изолированы друг от друга. Один из таких приледниковых водоемов находился на месте современного бассейна реки Печоры. По нашему мнению, хариусы, обитающие в бассейне данного водоема, были изолированы от остальных группировок этого вида в течение продолжительного периода времени.

В постледниковый период хариус из «уральского» рефугиума заселил современный бассейн реки Печоры и географически близкие речные системы, например р. Индиги. Водоемы, расположенные к западу от р. Индиги, по всей вероятности, были реколонизованы хариусом из других приледниковых озер, расположенных к западу от Урала. Подтверждением того, что хариус из «уральского» рефугиума не участвовал в заселении «западных» водоемов, является отсутствие в этих водоемах полиморфизма по локусам *IDHP-3**, *LDH-C**.

По нашему мнению, «уральский» рефугиум мог явиться источником реколонизации европейским хариусом не только бассейна Печоры и близлежащих водоемов бассейна Баренцева моря, но и, частично, бассейна реки Кама. Доказательством тому является наличие у хариуса из нерестовых притоков р. Камы генетических маркеров (аллелей *IDHP-3*87*, *LDH-C* 115*), обнаруженных только у хариусов из рек Печоры и Индиги (Титов, неопубл. данные).

Полученные нами данные находятся в некотором несоответствии с вышеизложенным предположением (Koskinen et al., 2000; 2002) о существовании единой, генетически однородной «восточной» линии европейского хариуса, послужившей источником для реколонизации северной части Европы в постледниковый период времени. По нашему мнению, возможен иной сценарий событий. Не исключено, что хариусы, обитающие в водоемах Уральского региона (Печора и другие реки Баренцева моря, часть рек Камского бассейна), представляют собой самостоятельную генетическую линию, обособленную в течение продолжительного периода времени и близкую к исходной, «прародительской» форме европейского хариуса. Постледниковая реколонизация северной части Европы, по нашему мнению, могла произойти из приледниковых водоемов, расположенных к западу от Урала, например, на территории современных бассейнов рек Онега и Северная Двина.

Решение дискуссионного вопроса о степени генетической дифференциации и путях постледникового расселения европейского хариуса требует дополнительных генетических данных. Наибольший интерес представляет выяснение филогенетических связей хариусов, обитающих в бассейне р. Камы и в малых реках Баренцева моря, расположенных к востоку от р. Индиги. Результаты подобных исследований позволят внести ясность в общую картину расселения хариуса на территории Европы и решить вопрос о правомерности выделения

«уральской» группы хариусов в отдельную эволюционно значимую линию (ESU), что принципиально важно для разработки стратегии охраны европейского хариуса как вида.

Литература

- Груздев А. И. Сравнительная характеристика изоферментных спектров лактатдегидрогеназы лососевых рыб Карелии // Экологическая биохимия животных. Сб. науч. тр. Ин-та биологии Карельского фил. АН СССР. Петрозаводск, 1976. С. 69–76.
- Ермоленко Л. Н., Пустовойт С. П., Макоедов А. Н., Викторовский Р. М. Генетика изоферментов лактатдегидрогеназы у лососевых рыб // Генетика. 1987. Т. 23 (2). С. 344–354.
- Квасов Д. Д. Позднечетвертичная история крупных озер и внутренних морей восточной Европы. Л.: Наука, 1975. 278 с.
- Корочкин Л. И., Серов О. Л., Манченко Г. П. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 279 с.
- Павлов Д. С., Нездолый В. К., Островский М. П., Фомин В. К. Хоминг у европейского хариуса *Thymallus thymallus* в бассейне верхней Волги // Вопросы ихтиологии. 1998. Т. 38 (4). С. 569–570.
- Шубин П. Н. Электрофоретические исследования гемоглобина и белков сыворотки крови европейского хариуса *Thymallus thymallus* L. // Вопросы ихтиологии. 1979. Т. 19 (2). С. 371–373.
- Шубин П. Н., Ефимцева Э. А., Челпанова Т. И., Шубин Ю. П. Аллозимная изменчивость лососевидных рыб Европейского Севера. Сыктывкар, 2000. 100 с.
- Aebersold P. B., Winans G. A., Teel D. J., Milner G. B., Utter F. M. Manual for Starch Gel Electrophoresis: A Method for the Detection of Genetic Variation // NOAA Technical Report NMFS, 1987. № 61. 19 p.
- Bertok M., Budihna Š. Annual report of fish cadastral register for year 1997 // Fisheries Research Institute, Ljubljana Slovenia. 1999.
- Black W. C. BIOSYS-2. A computer program for the analysis of allelic variation in genetics. Department of Microbiology, Colorado State University, 1997.
- Bouvet Y., Soewardi K., Pattee E. Genetic divergence within natural populations of grayling (*Thymallus thymallus*) from two French river systems // Archiv Fur Hydrobiologie. 1990. V. 119. P. 89–101.
- Cross T. F., Ward R. D. Protein variation and duplicate loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. // Genet. Res. 1980. V. 36 (2). P. 147–165.
- Davis B. J. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964. 121. P. 404–427.
- Engbrecht C. C., Freyhof J., Nolte A., Rassmann K., Schliewen U., Tautz D. Phylogeography of the bullhead *Cottus gobio* (Pisces: Teleostei: Cottidae) sug-

- gests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations // *Molecular Ecology*. 2000. V. 9. P. 709–722.
- Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) v.3.5c. Department of Genetics, The University of Washington, Seattle, WA, 1993.
- Fraser D. J., Bernatchez L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units // *Molecular Ecology*. 2001. V. 10. P. 2741–2752.
- Gross R. R., Kühn R., Baars M., Schröder W., Stein H., Roymann O. Genetic differentiation of European grayling populations across the Main, Danube and Elbe drainages in Bavaria // *Journal of Fish Biology*. 2001. V. 58. P. 264–280.
- Koskinen M. T., Ranta E., Piironen J., Veselov A., Titov S., Haugen T. O., Nilsson J., Carlstein M., Primmer C. R. Genetic lineages and postglacial colonization of the grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in Europe, as revealed by mitochondrial DNA analyses // *Molecular Ecology*. 2000. V. 9. P. 1609–1624.
- Koskinen M. T., Piironen J., Primmer C. R. Interpopulation genetic divergence in European grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) at a microgeographic scale: implications for conservation // *Conservation Genetics*. 2001. V. 2. P. 133–143.
- Koskinen M. T., Nilsson J., Veselov A. Je., Potutkin A. G., Ranta E., Primmer C. R. Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling // *Heredity*. 2002. V. 88. P. 391–401.
- Koskiniemi J., Kilpinen K. Harjuskantojen perinnöllisten erojen selvityes // *Suomen Kalastuslenti*. 1987. V. 94. P. 424–427.
- Kristiansen H., Doving K. The migration of spawning stocks of grayling *Thymallus thymallus*, in the lake Mjosa, Norway // *Environ. Biol. Fish.* 1996. V. 47. P. 43–50.
- Lelek A. Threatened fishes of Europe. In: *The Freshwater Fishes of Europe*. 9 (eds. European Committee for the Conservation of Nature, Natural Resources-Council of Europe): 93–96. AULA-Verlag, Wiesbaden, 1984.
- Lynch J. C., Vyse E. R. Genetic variability and divergence in grayling (*Thymallus arcticus*) // *Genetics*. 1979. V. 92. P. 263–278.
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics*. 1978. V. 89. P. 583–590.
- Nesbø C. L., Fossheim L. A., Vøllestad A., Jakobsen S. Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization // *Molecular Ecology*. 1998. V. 8. P. 1387–1404.
- Nilsson J., Gross R., Asplund T., Dove O., Jansson H., Kelloniemi J., Kohlman K., Loytynoja A., Nielsen E. E., Paaver T., Primmer C., Titov S. F., Vasemagi A., Veselov A., Ost T., Lumme J. Matrilinial phylogeography of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Europe and postglacial colonization of the Baltic Sea area // *Molecular Ecology*. 2001. V. 10. P. 89–102.
- Osinov A. G., Bernatchez L. ‘Atlantic’ and ‘Danubian’ phylogenetic groupings of brown trout *Salmo trutta* complex: Genetic divergence, evolution and conservation // *Journal of Ichthyology*. 1996. V. 36. P. 723–746.
- Peacock A. C., Bunting S. L., Quenn K. G. Serum protein electrophoresis in acrilamide gel: patterns from normal human subjects // *Science*. 1965. V. 147. P. 1451–1452.
- Persat H. Threatened populations, and conservation of the European grayling, *Thymallus thymallus* (L., 1758) // In: *Conservation of Endangered Fishes of Europe* (eds. Kirchhofer A, Hefti D). Birkhäuser Verlag, Basel, 1996. P. 233–247.
- Persat H., Eppe R. Alevinage, pollution et cloisonnement de l'espace fluvial dans les structures génétiques des populations de poisson: l'ombre commun, *Thymallus thymallus*, dans le Rhône au niveau de la Savoie // *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*. 1997. № 344/345. P. 287–300.
- Ring O., Jansson H., Öst T., Andersson T. Inheritance of allozymes in the European grayling (*Thymallus thymallus* L.) // *Hereditas*. 1994. V. 120. P. 159–163.
- Schöffmann J. The grayling species (Thymallinae) of three different catchment areas of Mongolia // *Journal of the Grayling Society*. 2000. Spring. P. 41–44.
- Shaklee J. B., Allendorf F. W., Morizot D. C., Whitt G. S. Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish // *Transactions of American Fisheries Society*. 1990. 119. P. 2–19.
- Shaw C. R., Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes – a compilation of recipes // *Biochemical Genetics*. 1970. V. 4. P. 297–320.
- Sušnik S., Snoj A., Dovč P. Evolutionary distinctiveness of grayling (*Thymallus thymallus*) inhabiting the Adriatic river system, as based on mtDNA variation // *Biological Journal of the Linnean Society*. 2001. V. 74. P. 375–385.
- Swofford D. L., Selander R. B. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics // *Journal of Heredity*. 1981. V. 72. P. 281–283.
- Uiblein F., Jagsch A., Honsig-Erlenburg W., Weiss S. Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters // *Journal Fish Biology*. 2001. V. 59 (Supplement A). P. 223–247.
- Weiss S., Persat H., Eppe R., Schlotterer C., Uiblein F. Complex pattern of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region // *Molecular Ecology*. 2002. V. 11. P. 1393–1407.
- Wright S. Evolution and the genetics of populations. Vol.4. Variability within and among populations. University of Chicago Press, Chicago, 1978.