

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ГОЛЬЦОВ РОДА *Salvelinus* ИЗ ВОДОЕМОВ КУРИЛЬСКИХ ОСТРОВОВ

© 2007 г. Е.А. Шубина^{1*}, Е.В. Пономарева¹, О.Ф. Гриценко²

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва; факс: (495)939-3181,
электронная почта: shubina@genebee.msu.su

² Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии, 107140 Москва,
ул. Верхняя Красносельская, 17

Поступила в редакцию 04.09.07

Методом ПЦР-RAPD с исследовано генетическое сходство 35 различных выборок гольцов *Salvelinus alpinus* *krasheninnikovi* (*Salvelinus malma* *krasheninnikovi*) с островов: Шумшу, Парамушир, Онекотан, Итуруп и Кунашир. Показано, что в пределах каждого острова как жилые изоляты, так и проходные формы образуют статистически строго поддерживаемые кластеры, изолированные от выборок с других островов. Выборки с пяти островов формируют три суперкластера: первый – о. Кунашир + о. Итуруп, второй – о. Парамушир + о. Онекотан и третий – о. Шумшу. Рассмотрены возможные причины генетического сходства жилых и проходных форм мальмы, населяющих водоемы одного острова (эффект основателя, хоминг, ограниченная миграция).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ПЦР-RAPD, мальма, Курильские о-ва, кластерный анализ.

Населяющий Курильские о-ва голец – мальма (*Salvelinus malma*, W), в настоящее время признается большинством систематиков как самостоятельный вид гольцов или же как группа форм в пределах сложного вида *Salvelinus alpinus* – *malma complex* [1, 2]. Она является одним из наиболее распространенных в северной части Тихого океана и, возможно, наименее изученных представителей рода *Salvelinus*. В настоящее время мальму, обитающую в водоемах дальневосточного региона России, подразделяют, главным образом, на северную *S. a. malma* (*S. m. malma*) и южную *S. a. krasheninnikovi* (*S. malma. krasheninnikovi*) разновидности как по морфологическим признакам [3–6], так и по результатам генетического анализа митохондриальной ДНК [7, 8], нуклеотидным последовательностям спейсеров ядерных рибосомных генов [9], аллозимному анализу [10]. При этом, однако, оговаривается неопределенность таксономического статуса южной мальмы и глубины дивергенции между южной и северной формами [11]. Существует также точка зрения, основанная на данных по частоте встречаемости различных гапло-

типов мтДНК [12], согласно которой морфологически сходная мальмоидная группа видов гольцов включает как самостоятельные виды южную азиатскую мальму *S. curilus* (Pallas, 1814), типичную мальму *S. malma*, а также некоторые другие родственные мальме виды гольцов. Мальма, обитающая в водоемах о-вов Курильской гряды, стала объектом систематического изучения лишь в последние годы. Были описаны многочисленные формы как проходные, так и жилые изолированные ручьевые, речные и озерные [13–18]. Была получена информация о существовании в водоемах северных Курильских островов самовоспроизводящихся речных и ручьевых гольцов, изолированных от проходных. Некоторые изоляты сильно выделялись по фенотипическим признакам. Например, форма из оз. Большое Черное отличалась от проходной и речной мальмы и от других озерных гольцов о. Парамушир и обнаруживала сходство как с некоторыми формами гольцов азиатского побережья Тихого океана, так и с американскими *S. confluentis*, *S. namaycush*, *S. fontinalis* [19]. С другой стороны, был сделан вывод о большей фенотипической близости различных форм гольцов, принадлежащих к водоемам одного острова, чем гольцов одной формы из водоемов различных островов [20]. Популяционно-генетический

Принятые сокращения: т.п.н. – 1000 пар нуклеотидов, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

* Адресат для корреспонденции и запросов отпечатков.

анализ южной формы мальмы восьми крупнейших Курильских островов на основе аллозимных маркеров показал отсутствие корреляции между генетической структурой и географической локализацией популяций [21]. Поддержанные кластеры объединили гольцов Парамушира и Итурупа с одной стороны, и Онекотана и Кунашира — с другой. Отдельную ветвь сформировали гольцы о. Шумшу. Распределение частот аллелей некоторых локусов позволило предположить присутствие на о. Шумшу северной формы.

В настоящей работе гипотеза о близости всех форм мальмы в пределах одного о-ва находит строгое подтверждение в результате анализа молекулярно-генетических данных, полученных с использованием метода полимеразной цепной реакции со случайными праймерами (или ПЦР-RAPD), примененному к большому количеству проходных и жилых форм *S. alpinus krasheninnikovi* по всему интересующему ареалу.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Весь предоставленный нам материал северной и южнокурильской мальмы в виде спиртовых препаратов молока и печени был собран в экспедициях, организованных ВНИРО в 2000–2001 гг. Описание выборок представлено в табл. 1. Схема-карта сбора материала изображена на рис. 1.

Геномную ДНК из курильских гольцов выделяли из лизированных гуанидинтиоцианатом тканей с помощью сорбции на твердом носителе (набор реактивов Diatom™ DNAprep 100, «Лаборатория ИзоГен», Россия) в соответствии с рекомендациями фирмы изготовителя. Выход ДНК составлял в среднем 0,5–1 мкг в 5 мкл раствора. Проверку выделенных препаратов на полимерность проводили с помощью электрофореза в 0,6%-ной агарозе. Размер препаратов ДНК составлял 40–50 т.п.н. и удовлетворял требованиям ПЦР.

Использованный в работе метод основан на случайной амплификации относительно коротких последовательностей ДНК, фракционируемых затем электрофорезом в агарозе или ПААГ [22, 23]. В работе была применена модификация ПЦР [24] с использованием комбинаций двух случайных 20-нуклеотидных праймеров-затравок. Нами было проверено 91 сочетание праймеров, из которых для дальнейшей работы выбрано 15. Основой для выбора праймеров служило наличие полиморфизма хотя бы по одному из фрагментов — продуктов ПЦР. Последовательности праймеров приведены в табл. 2. В этой же таблице приведены размеры фрагментов, кото-

рые, за единичными исключениями, являлись общими для всех выборок мальмы. Воспроизведение этого набора фрагментов в каждой соответствующей реакции для всех выборок мальмы служило внутренним контролем воспроизводимости.

Реакции проводили в 25 мкл 0,01 М Tris-HCl pH 8,3, содержавшего 0,05 М KCl, смесь четырех dNTP по 0,2 мМ каждого, 5,5 мМ MgCl₂, соответствующую пару праймеров (табл. 2) в количестве 5 пикомолей каждого, Taq-полимеразу («Диалат», Россия) по 2 ед. активности на пробу и ~20 нг исследуемой ДНК [25]. Препараты ДНК разводили непосредственно перед опытом. Были поставлены необходимые контроли на чистоту праймеров и ДНК-матриц. ПЦР проводили по следующей программе: 95° — 2 мин, три цикла: 94° — 45 с, 50° — 30 с, 72° — 30 с и 35 циклов: 94° — 45 с, 60° — 30 с, 72° — 30 с.

Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в горизонтальном 1,8%-ном агарозном геле (агароза тип II, «Sigma», США) в буфере TBE в присутствии бромистого этидия при 7 В/см в течение 3,5 часов. Одновременно проводили электрофорез 40–65 препаратов, разделяемых в одном поле.

Были использованы многочисленные технические приемы для повышения воспроизводимости результатов. Все реакции амплификации с конкретной парой праймеров осуществляли из единого разведения одновременно (300–400 реакций в день). ПЦР проводили с использованием методики «горячего старта» с использованием Taq-полимеразы, ассоциированной с антителимами, что позволило исключить различия между пробами, смешанными в начале и конце опыта. Каждая реакция была поставлена в двух параллелях. Было проверено единообразие температурных режимов в ячейках термоциклера, использованы пробирки одного типа, одни и те же партии реактивов для проведения ПЦР и электрофоретического разделения фрагментов. Особое внимание, с учетом результатов предварительных экспериментов, было уделено соблюдению одинаковых количественных соотношений между ДНК-матрицами и праймерами. Все препараты ДНК, использованные в данной работе, были получены однократно, т.е. имели определенную полимерность, концентрацию и степень очистки. Таким образом, количественные соотношения в реакциях были стандартизованы, и воспроизводимость их в повторных экспериментах достигала 100%. Разделение продуктов реакций проводили в едином электрическом поле отдельно для коллекций, собранных на разных островах. Меньшие по размеру выборки с о. Кунашир и о. Итуруп анализировали в од-

Таблица 1. Географическая локализация выборок мальмы

№ п/п	№ препарата	Местность	Форма	Кол-во образцов
о. Парамушир				
1	25	Тихоокеанская сторона, оз. Большое Черное	озерный жилой	5
2	14	Охотоморская сторона, р. Покой	проходной	5
3	19	Охотоморская сторона, р. Чайка	проходной	5
4	21	Охотоморская сторона, р. Шелеховка	проходной	5
5	4	Северная сторона, ручей Аэродромный	ручьевой жилой	5
6	7	Тихоокеанская сторона, ручей Северянка	ручьевой жилой	5
7	9	Тихоокеанская сторона, оз. Подлагерное	озерный жилой	5
8	13	Тихоокеанская сторона, оз. Трехсопочное	озерный жилой	5
О. Онекотан				
9	3	Охотоморская сторона, р. Озерная	проходной	4
10	10	Тихоокеанская сторона, р. Ольховка	проходной	5
11	15	Тихоокеанская сторона, р. Кедровка	проходной	5
12	17	Охотоморская сторона, ручей Гольцовый у погранзаставы Шестакова	проходной	5
13	20	Охотоморская сторона, ручей Фонтанка -левая, ниже водопада	проходной	5
14	5	Охотоморская сторона, ручей Фонтанка, выше водопада	ручьевой жилой	5
15	2	Охотоморская сторона, ручей Маршука у погранзаставы Шестакова	ручьевой жилой	5
16	6	Охотоморская сторона, ручей Анечкин возле устья реки Озерной	ручьевой жилой	5
О. Шумшу				
17	8	Охотоморская сторона, р. Беттобу, устье	проходной	5
19	11	Охотоморская сторона, р. Курбатовка, верховье	проходной	4
20	12	Северная сторона, р. Курбатовка, верховье	проходной	3
21	16	р. Острожная (Серединка)	проходной	5
22	18	Охотоморская сторона, р. Беттобу, устье	проходной	5
23	24	ручей Юдина	проходной	5
24	23	ручей Южный	озерно-ручьев. изолят	5
О. Кунашир				
25	28	р. Большева (приток р. Филатовки)	п./проходной	5
26	29	р. Тятинка	п. /проходной	2
27	26	р. "Над водопадом"	ручьевой карлик?	5
28	27	р. "Второй водопад"	ручьевой жилой карлик?	5
О. Итуруп				
29	34	р. Славная	п./проходной	5
30	35	р. Сопочная	проходной	2
31	32	оз. Красивое	проходной	1
32	33	оз. Красивое	озерный жилой	4
33	30	р. Кумушка, приток реки Глушь	речной жилой	5
34	31	оз. Сопочное	озерный жилой	5
35	36	ручей в бухте Славная	жилкой карлик	6

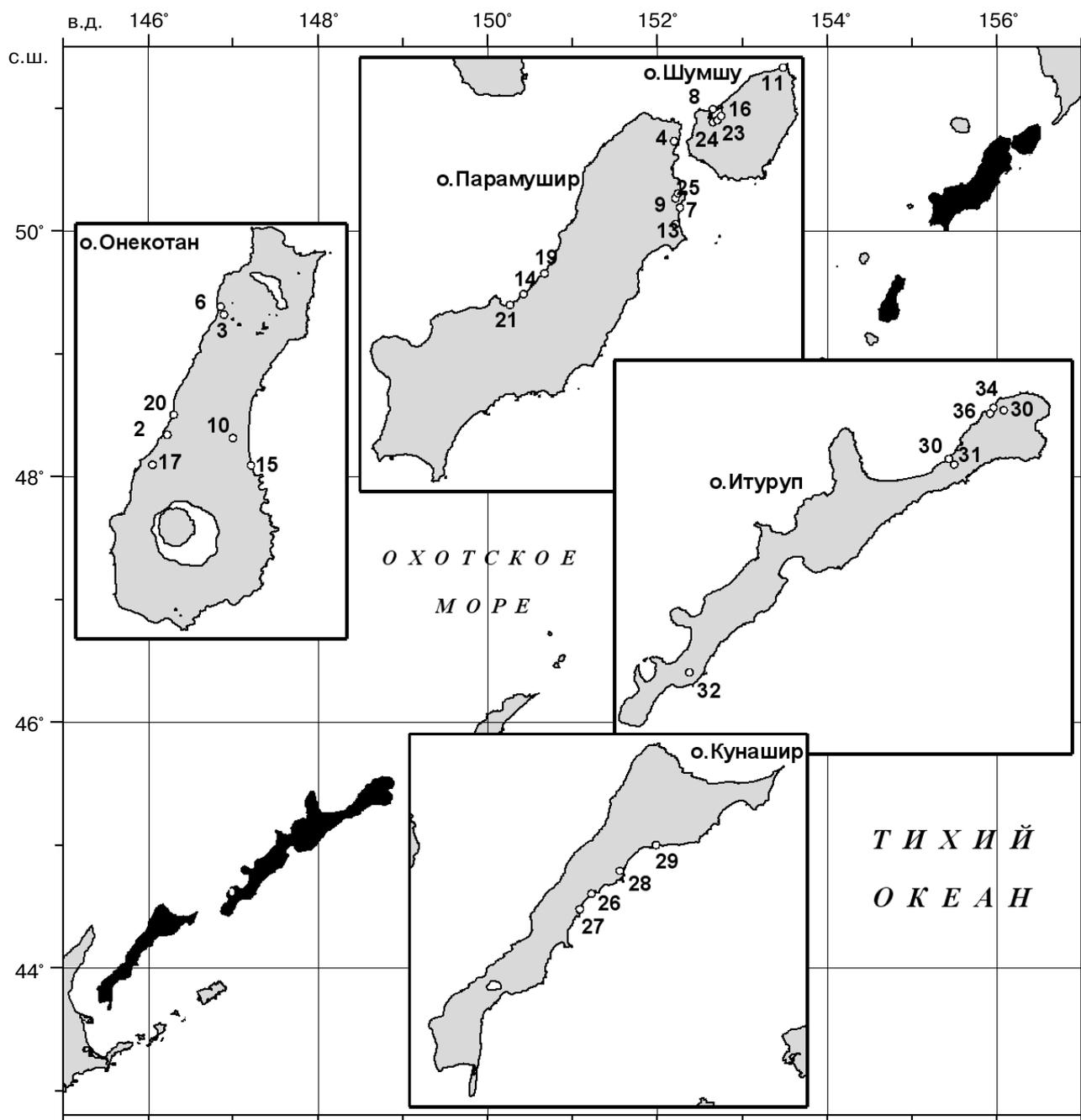


Рис. 1. Схематическая карта локализации выборок мальмы. Цифры соответствуют номерам препаратов в табл. 1

ном эксперименте. Сравнение выборок со всех островов в едином геле было невозможно, потому что суммарная ширина анализировавшихся образцов составляла бы ~1 м. В этом случае осуществляли компиляцию гелей за счет перекрестных образцов, введенных в каждую полосу каждого электрофореза (рис. 2).

Редактирование фотографий гелей (выравнивание) осуществляли с помощью программы Adobe Photoshop 7,0. Типирование и определение размеров фрагментов проводили с помощью программы Gel-Quant Electrophoresis Software (Free Trial, http://www.ampl.com.au/gq_frames.htm) с дополнительной ручной коррекцией.

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных в реакциях RAPD-ПЦР, и размеры основных фрагментов в нуклеотидных парах, создававших профили электрофоретического разделения продуктов соответствующих реакций

№ п/п	обозначение	Праймеры		Размеры основных фрагментов амплификации (в парах оснований)
		прямой: 5' → 3'	обратный: 5' → 3'	
1	4sm	TGTGACTGCTTGTAGATGGC	GAAGCTGCTATGCTTCGTAT	525, 415
2	14sm	TGGAGCTGTGTAAGAAGTAC	TCATCTTCTTCCTCTTCTTC	500, 440–460, 180
3	16sm	AAAAGACATGAAGACTCAGC	ATCCCTGTCAAAGTAGCGT	964–994, 513, 420
4	18sm	AAAAGACATGAAGACTCAGC	GAAGCTGCTATGCTTCGTAT	1030, 370
5	30sm	TGGACAGTACGGTGAATGC	ATCCCTGTCAAAGTAGGGT	1320, 750, 610, 460, 410, 340
6	31sm	TGGACAGTACGGTGAATGC	GACCACTTTCTTGCCATGAG	1320, 610, 530, 430, 290, 255
7	32sm	TGGACAGTACGGTGAATGC	GAAGCTGCTATGCTTCGTAT	1280, 680, 640, 410, 285, 215
8	32'sm	TGGACAGTACGGTGAATGC*		1250, 740 630, 315
9	37sm	CATAAATTGCTTTAAGGCG	ATCCCTGTCAAAGTAGCGT	900, 420, 410
10	43sm	CTCAGAGTCCAACCTGGGTTAG	CGTTGCAAGACAGACCTCCG	1100, 490, 410
11	44sm	CTCAGAGTCCAACCTGGGTTAG	ATCCCTGTCAAAGTAGGGT	950, 750, 380, 288–295, 220
12	45sm	CTCAGAGTCCAACCTGGGTTAG	GAGCACTTTCTTGCCATGAG	750, 340, 285
13	56sm	TGGAGCTGTGTAAGAAGTAC	AAAAGACATGAAGACTCAGG	1000, 460–416, 360
14	71sm	CGTTGGAAGACAGACCTCCG	ATCCCTGTCAAAGTAGGGT	935–910, 454–410
15	77sm	ATCCCTGTCAAAGTAGGGT	GAGCACTTTCTTGCCATGAG	917–820, 260

* В реакции был использован один праймер.

Фрагменты для анализа отбирали автоматически при помощи программы Gel-Quant при установке определенного уровня чувствительности. Определялся размер фрагментов, и данные табулировались. Набор отобранных фрагментов составлял паттерн. Бинарная матрица состояния признаков составлялась по принципу присутствия-отсутствия фрагмента с одинаковой электрофоретической подвижностью. Обработку данных проводили в несколько этапов: анализ всей коллекции жилых форм, анализ всех проходных форм и совместный анализ проходных и жилых форм каждого острова. При анализе проходных и жилых форм каждого острова суммарной и объединенной выборки жилых гольцов табуляцию осуществляли с помощью программы Gel-Quant. В последнем случае число проанализированных признаков доходило до 740. Для суммарной выборки проходных форм табуляция осуществлялась вручную, и число признаков составило 340. Причина несоответствия в большей чувствительности программы по сравнению с визуальной оценкой. Пример электрофоретического паттерна и соответствующая карта-схема приводятся на рис. 2.

Кластерный анализ с построением дендрограмм проводили дистанционным методом связывания близлежащих соседей (Neighbor-Joining, NJ) [26]. Парные генетические дистанции между паттернами вычисляли по Нею и Ли [27]. Метод Нея и Ли основан на расчете индекса подобия Чекановского S , который вычисляется по формуле

$$S = 2n_{ab}/(n_a + n_b),$$

где n_a – число полос в паттерне а, n_b – в паттерне b, а n_{ab} – число полос, присутствующих в паттернах обоих сравниваемых образцов. Построения дистанционных деревьев проводили с помощью программы TREECON 1.3b [28]. При альтернативном, кладистическом способе анализа (построении максимально экономных, МР-деревьев) учитывается количество шагов, необходимое для перехода 0 («нет полосы») в 1 («есть полоса») в бинарной матрице признаков – парсимония Вагнера (PAUP: <http://www.lms.si.edu/PAUP/>), парсимония Долло учитывает и обратный переход. Для построения МР-деревьев использовали программы MIX, DOLLOP и CONSENCE из пакета PHYLIP 3.6.

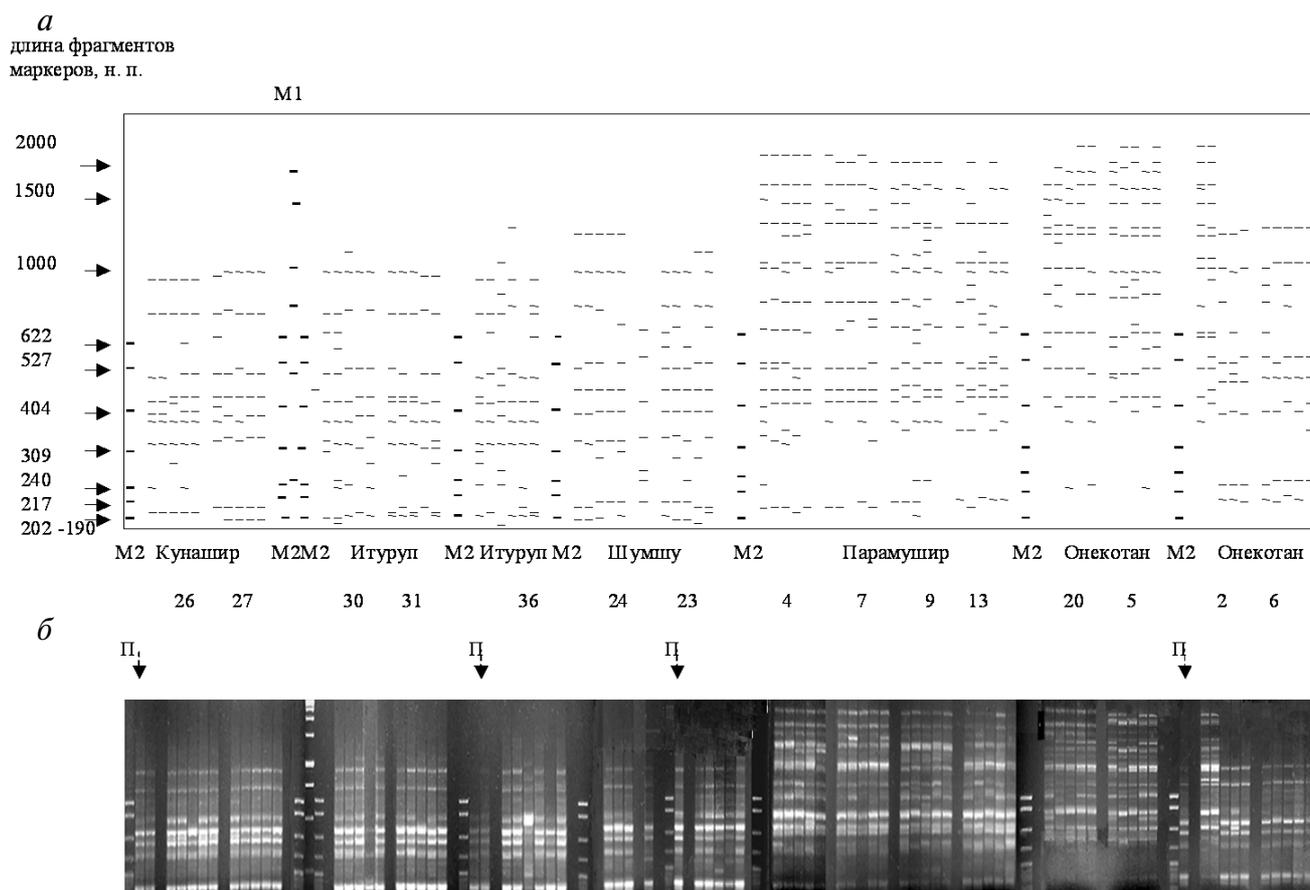


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР-RAPD жилых форм мальмы Курильских о-вов с парой праймеров 43sm. M1, M2 – маркеры молекулярного веса: M1 – 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 н.п., M2 – 622, 527, 404, 309, 240, 217, 202 н.п. *a* – Компиляционная карта-схема агарозного геля, цифрами обозначены номера выборок. *б* – Комбинированная картина электрофоретического разделения. Вертикальные стрелки – перекрестные реакции (на панели *a*) не представлены)

В обоих случаях определение устойчивости узлов проверялось с помощью бутстрэп-анализа [29]. При этом оценке подлежали не выборки, а признаки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ выборок с отдельных островов. Общий экспериментальный объем работы с учетом повторных экспериментов составил приблизительно 5300 ПЦР. Количество проанализированных признаков для отдельных островов составляло от 320 для гольцов о. Онекотан до 540 для гольцов о. Шумшу.

Анализ выборок, проведенный для каждого острова отдельно, выявил некоторые общие закономерности. Наряду с общими для каждой из реакций «профильными» полосами (табл. 2) наблюдался значительный полиморфизм в «до-

полнительных» полосах как между, так и внутри каждой из выборок. Однако «диагностических», т.е. свойственных лишь какой-то одной выборке, мономорфных полос в использованной системе маркеров отмечено не было. Небольшой размер выборок (в среднем около пяти), обусловленный малым размером ручьевых популяций, не позволяет проводить количественную оценку полиморфизма отдельных признаков в каждой выборке. На рис. 3, *a–г* приводятся обобщенные генетические дистанции в виде масштабированных неукорененных NJ-дендрограмм для жилых и проходных выборок отдельных островов.

Все выборки о. Парамушир, по географическим соображениям и морфологическим признакам ранее описанные как жилые формы, демонстрируют обособленность от прочих (индексы бутстрэпа 46–96%). Таким образом, доказывается генетическая обособленность каждой из этих

выборок. Все выборки о. Парамушир (рис. 3, а) сформировали два устойчивых (70% поддержки бутстрэпа) кластера, один из которых объединил четыре из пяти проанализированных жилых форм, а другой – проходные формы. Кластер проходных форм включает также жилых гольцов из озера Большое Черное, составляющих изолированную группу в его составе. Возможно, это объясняется более поздним проникновением проходных гольцов в оз. Большое Черное.

Две ручьевые и две озерные выборки о. Парамушир проявили тенденцию к объединению в «ручьевой» и «озерный» кластеры со слабой поддержкой – 39 и 37% бутстрэпа соответственно (рис. 3, а). В кластере «проходных гольцов» каких-либо хорошо поддержанных групп, за исключением выборки озера Большое Черное, не выявлено. Наибольшим генетическим полиморфизмом из проходных малым о. Парамушир характеризовались гольцы р. Покой (выборка 14, табл. 1). Это связано с тем, что два экземпляра из выборки имеют почти вдвое большие генетические дистанции, выраженные длиной ветвей, по сравнению с остальными (рис. 3, а).

Восемь выборок с о. Онекотан (рис. 3, б) также распределились сходным образом: на кластеры преимущественно жилых (все – с охотоморской стороны острова) и проходных форм. Однако статистическая поддержка этих кластеров слабая (34% бутстрэпа). Так же как и для о. Парамушир, подтверждается генетическая обособленность выборок жилых форм о. Онекотан: для гольцов ручья Маршука она выражается в 72% поддержки бутстрэпа, и ручья Анечкин – 100%. Две формы гольцов ручья Фонтанка: жилая форма (№ 5), населяющая верховья ручья, и проходная (№ 20), нерестящаяся в низовье и отделенная от жилой географической преградой (водопадом), объединяются вместе (индекс бутстрэпа 47–50% при различных способах построения дерева). Это может быть следствием недавнего разделения этих популяций, или, что более вероятно, генетическая связь обеспечивается односторонним потоком генов от жилой формы. Остальные популяции проходных гольцов не образуют на дендрограмме групп, соответствующих сделанным выборкам (№ 3, 10, 15, 17). Это может быть связано с неразрешенностью в использованной системе маркеров либо, вероятнее, с отсутствием изоляции проходных рыб из разных ручьев о. Онекотан.

Южнокурильские гольцы были представлены четырьмя выборками с о. Кунашир и семью – с о. Итуруп (всего 45 рыб), в числе которых одна из проходных форм была представлена единственным экземпляром, а другая – двумя (табл. 1). Эти минимальные выборки в анализе также

учитывали. Разделение продуктов всех 45 ПЦР для данной пары праймеров проводили одновременно в одном электрофоретическом поле. На рис. 3, в представлены результаты кластерного анализа этих выборок гольцов. Так же как в выборках с о. Парамушир и о. Онекотан, из всех выборок генетическую обособленность обнаруживают лишь жилые формы, за исключением выборок из оз. Сопочное, р. Кумушка и р. Над водопадом, из которых по одному экземпляру попало в другие группы на дендрограмме. В целом островные популяции о. Кунашир и о. Итуруп в системе использованных маркеров выглядят более однообразными, чем гольцы о. Парамушир и о. Онекотан. Измерение генетических расстояний (с учетом масштаба) к висячим узлам, представляющим жилые формы на дендрограммах (рис. 3, а, в), показывает, что указанные расстояния для гольцов о. Кунашир и о. Итуруп в среднем на 14,4% меньше, чем для гольцов о. Парамушир. Вероятно, меньшим числом информативных (различающихся) признаков объясняется не столь строгая поддержка в анализе генетической изолированности каждой из выборок жилых форм. Проходные и полупроходные формы о. Кунашир и о. Итуруп, по данным нашего анализа, не объединяются в группы, соответствующие географическому положению выборок.

В целом гольцы, обитающие в водных системах о. Кунашир и о. Итуруп, разделились на самостоятельные кластеры, выявляющиеся в 42% деревьев при ресэмплинге (рис. 3, в). Каждый кластер представлен одновременно жилыми и проходными формами.

Материал по гольцам о. Шумшу имеет несколько иную структуру. Из семи выборок только одна представляет форму, которая была описана как озерно-ручьевой изолят из ручья Южный. Однако, в отличие от жилых форм рассмотренных выше островов, она не образовала изолированного кластера (рис. 3, г), а объединилась (с индексом 94% бутстрэпа) с проходными гольцами соседнего ручья Юдина. Таким образом, в генетическом отношении эта форма не является изолятом.

Ряд других выборок проходных гольцов о. Шумшу показали относительную генетическую обособленность. Это выборка р. Острожная (изолированность наблюдалась в 86% бутстрэпа), преднерестовая выборка № 8 р. Беттобу (30% бутстрэпа), преднерестовая выборка № 18 р. Беттобу, сделанная с промежутком в несколько дней относительно предыдущей (99% бутстрэпа). В оз. Беттобу впадает несколько относительно крупных речек, в каждой из которых, в принципе, может воспроизводиться са-

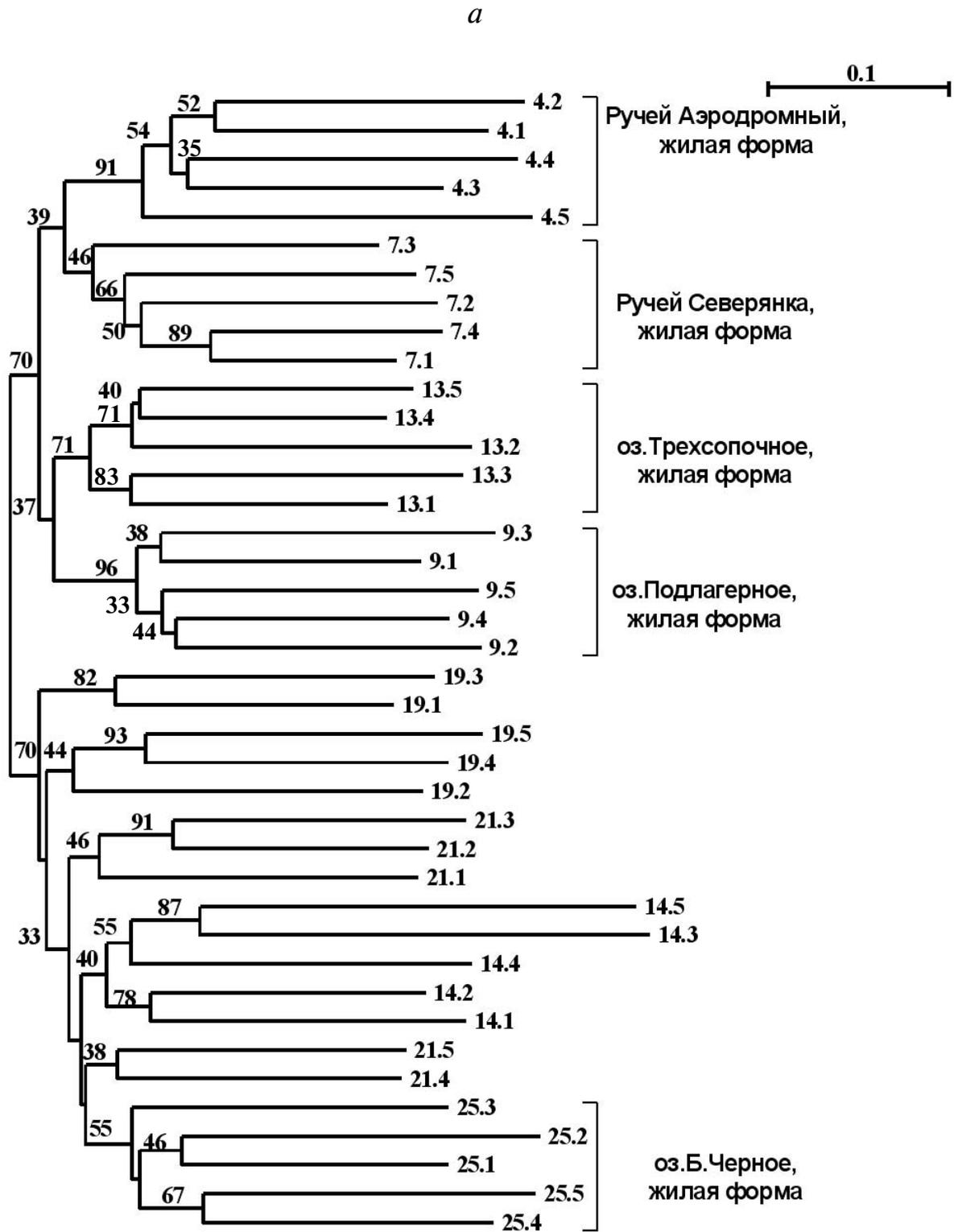
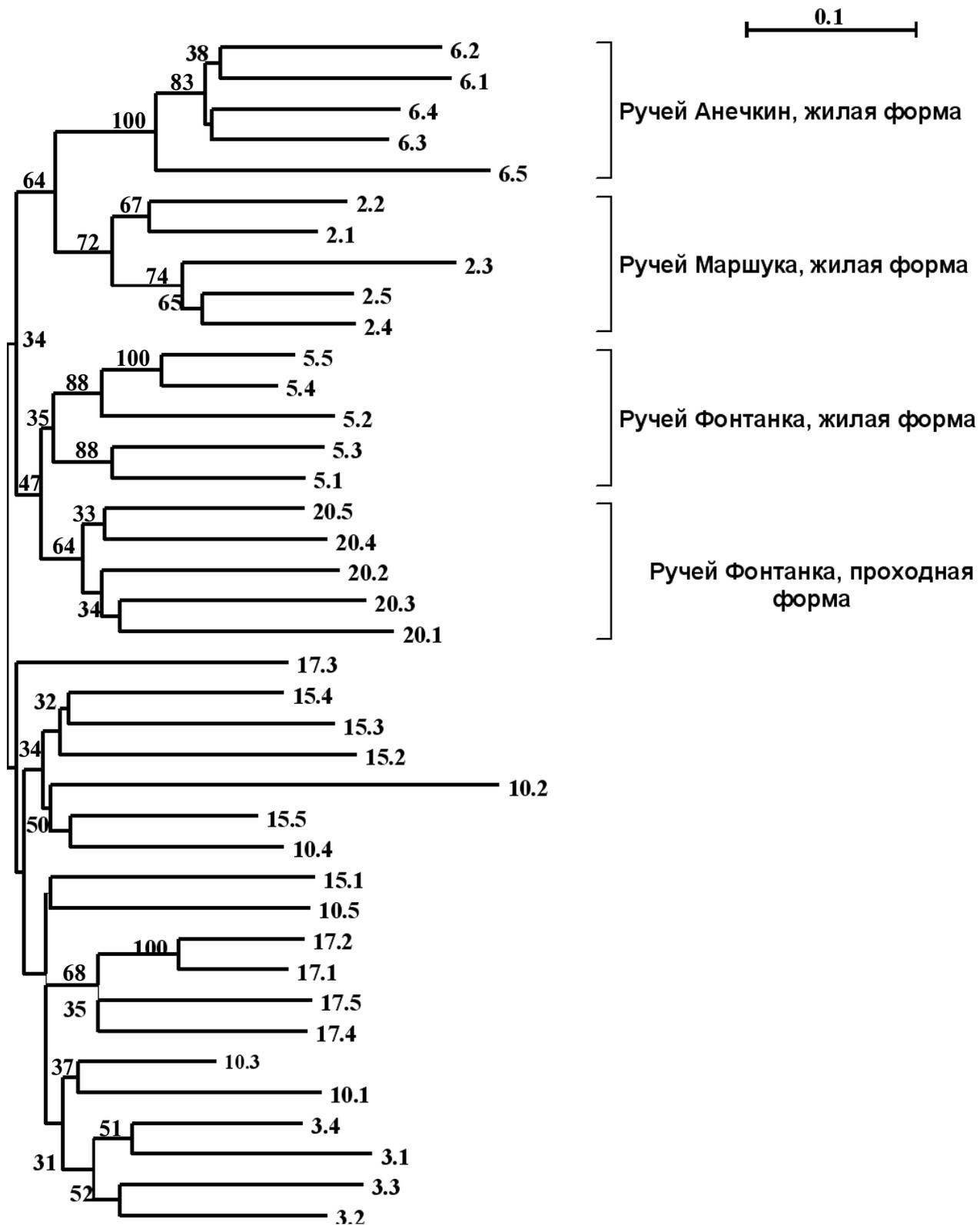


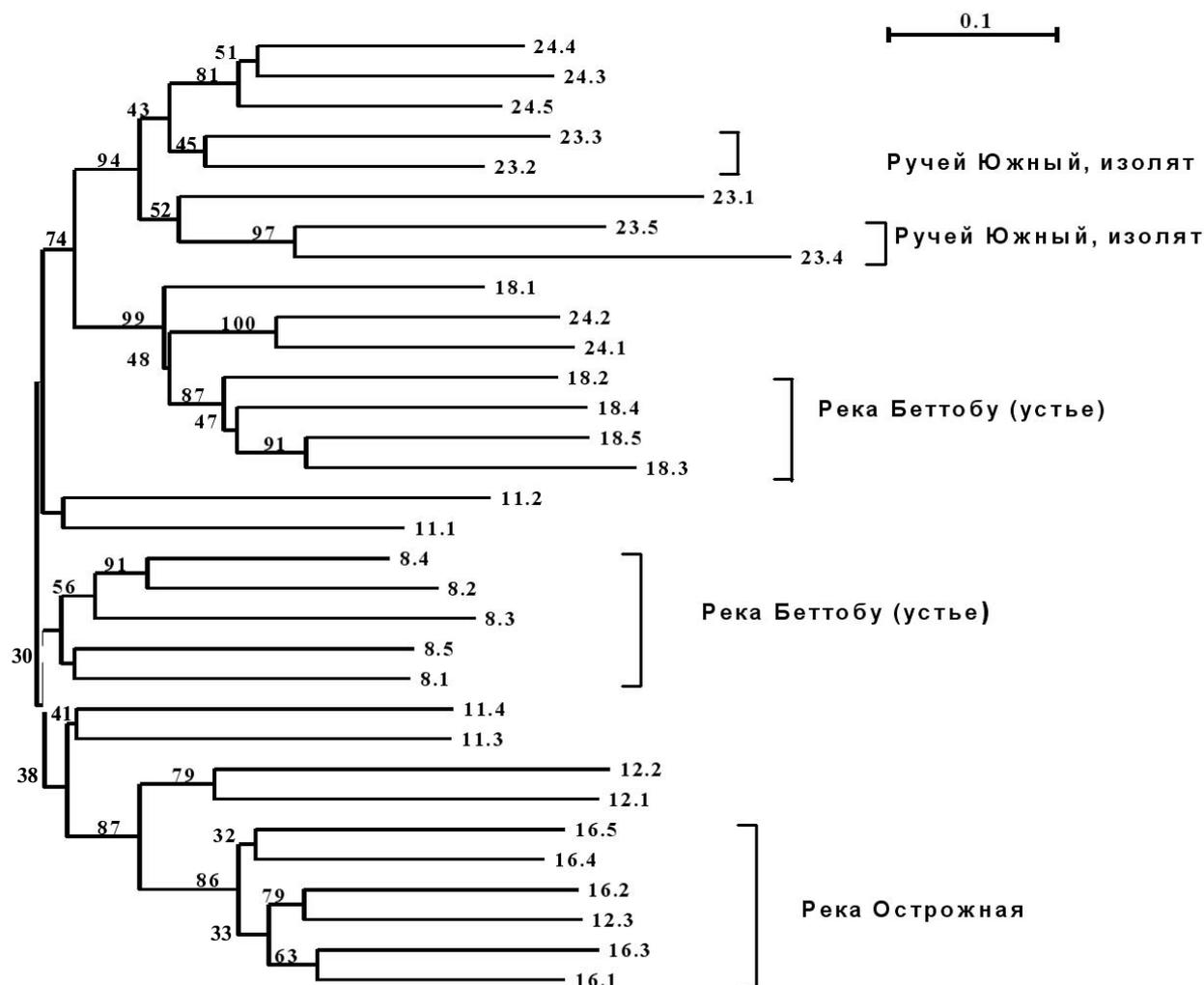
Рис. 3. NJ-дендрограмма жилой и проходной форм мальмы, построенная на основе генетических дистанций Неи и Ли с укоренением по средней точке. Обозначения ветвей содержат номер выборки и особи, согласно табл. 1. В узлах ветвления проставлены индексы бутстрэпа выше 30. Выделены генетически изолированные кластеры жилых форм. Для каждого дерева приведено число анализировавшихся признаков: о. Парамушир – 436 признаков (*a*), о. Онекотан – 320 признаков (*b*), о. Итуруп и Кунашир – 345 признаков (*e*), о. Шумшу – 540 признаков (*z*)

б



Продолжение рис. 3

2



Окончание рис. 3

мостоятельная популяция гольца. Что касается р. Беттобу, то это короткая протока, соединяющая озеро с Охотским морем. В устье этой реки взяты две пробы гольца (№ 8 и 18), попадающие в разные кластеры (рис. 3, 2). Наиболее вероятным объяснением этого феномена может быть то, что в пробы 8 и 18 попали особи из разных рек, впадающих в оз. Беттобу. Кластер, содержащий полную выборку № 18 р. Беттобу, включает, однако, два экземпляра из выборки № 24 (ручей Юдина). Это можно трактовать как результат нестроого хоминга проходных гольцов в пределах одного острова. Несмотря на наличие в дендрограмме смешанных кластеров, подобных разобранным, на о. Шумшу среди проходных гольцов выделяются отдельные, генетически хорошо обособленные от других группы (в отли-

чие от о. Парамушир и о. Онекотан). С нашей точки зрения, это свидетельствует о генетической неоднородности изученных популяций. Значительная разница в длинах ветвей, соответствующих генетическим расстояниям (в среднем до 50%), между особями о. Шумшу и остальными образцами на масштабированных островных дендрограммах является еще одним фактом в пользу такого предположения. Эти результаты не противоречат и данным по белковым маркерам [21].

Общая генетическая структура популяций мальмы Курильских о-вов. Для оценки степени дивергенции геномов мальмы по всему охваченному ареалу были отобраны 16 выборок, представлявших, в основном, изолированные жилые формы гольцов – ручьевые, озерные и речные

(рис. 4, *a*). Кроме изолятов, в анализ включили онекотанского проходного гольца ручья Фонтанка (№ 20), составляющего с выборкой № 5 единую водную систему, и проходного гольца из ручья Юдина, тесно группирующегося с жилой озерно-ручьевой формой (выборка № 23). Матрица включала 740 признаков для 76 особей.

По результатам анализа вся объединенная выборка распадается на три статистически достоверных кластера в соответствии с географической локализацией. Это кластеры южнокурильских (Итуруп и Кунашир), северокурильских (Парамушир и Онекотан) островов и отдельно о. Шумшу. Дальнейшее ветвление подчиняется строгой иерархии по «островному» принципу. Иными словами, прежде всего, группируются выборки, принадлежащие к водной системе одного и того же острова, затем выборки, обитающие внутри острова в сходных экологических условиях (например, кластер ручьевых и кластер озерных гольцов о. Парамушир). Указанная топология выявляется как при дистанционном NJ-, так и кладистическом (методом максимальной экономии) анализе и получает высокую статистическую поддержку (рис. 4, *a*, *b*). На морфологическом уровне отличия южнокурильской мальмы от северокурильской отмечались и ранее [30, 31].

Сходная топология, хотя имеющая не столь высокую поддержку, была получена также для выборок проходных форм гольцов (рис. 5, *a*, *b*). Так же как и в дереве жилых форм, выделяются суперкластеры северных Курильских о-вов, южных Курильских о-вов и обособленный кластер о. Шумшу. «Островной» принцип дальнейшего иерархического деления суперкластеров в основном сохраняется и для проходной мальмы. Исключение представляет результат NJ анализа в отношении южных Курильских островов, в котором кластер образуют только выборки о. Кунашир (рис. 5, *a*). Однако кладистический анализ подтверждает обособленность выборок проходных гольцов о. Итуруп от гольцов о. Кунашир (рис. 5, *b*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

О возможностях и воспроизводимости RAPD. Основная возможность, предоставляемая методом RAPD – непосредственное сравнение ДНК отдельных особей или их выборок. Таким образом, он может быть использован как метод популяционной генетики и систематики на видовом и внутривидовом таксономическом уровне.

По сравнению с другими методами популяционного анализа, такими как аллозимный ана-

лиз, RAPD имеет определенные особенности. Его преимуществом является учет очень большого числа признаков. Однако RAPD относится к так называемым доминантным маркерам. При оценке генотипов он не делает различий между доминантной гомозиготой и гетерозиготой, как это присуще кодоминантным, к примеру аллозимным, маркерам. Более того, различные аллели в RAPD могут проявляться не только в виде присутствия/отсутствия полосы, но и изменения электрофоретической подвижности, что практически не позволяет учитывать их как аллельные варианты одного локуса. Таким образом, вычисление аллельных частот, как это принято в аллозимном анализе, оказывается невозможным. Хотя разными авторами [32, 33] и предлагались поправки с целью вычисления для RAPD традиционных популяционно-генетических показателей, нам представляется более адекватным прямой учет электрофоретических полос как отдельных признаков в дистанционном или кладистическом анализе. В этом случае используется единственное допущение – гомологичность совпадающих по электрофоретической подвижности фрагментов ДНК. Ранее было показано, что при внутривидовых исследованиях гомология между комигрирующими RAPD фрагментами достигает 95% и редко опускается ниже 85% [34, 35]. Результатом RAPD-анализа является дерево генетических расстояний или кладограмма.

Недостатком RAPD анализа считается плохая воспроизводимость результатов ПЦР. Неустойчивость ПЦР со случайными праймерами неоднократно подчеркивалась многими авторами [36]. Несмотря на это, метод продолжает оставаться одним из наиболее распространенных [37]. Нам кажется, что причина популярности RAPD не только в относительной простоте и доступности, но и в том, что мнение о невоспроизводимости RAPD несколько преувеличено. Несомненно, существует ряд технических требований к применению метода. Некоторых из них мы коснулись в методической части, и они вполне выполнимы. Наш анализ курильских гольцов скорее дает основания для постановки вопроса о возможной недостаточной разрешающей способности (полиморфизме) использованных маркеров. Из 91 сочетания праймеров лишь 15 оказались пригодны для дискриминации. В остальных 76 сочетаниях наблюдалось полное единообразие электрофоретических паттернов.

Мы считаем, что доказательством объективного характера результатов, полученных в настоящей работе, является сама реконструированная генетическая структура исследованных по-

пуляций. Обнаруженная нами генетическая обособленность изолятов, а также кластеризация выборок в пределах островов кажутся естественными и говорят именно о стабильности результатов ПЦР и об их повторяемости от образца к образцу. Эти результаты не связаны с ошибками типирования, поскольку смешанные островные, суммарные жилые и проходные формы анализировались отдельно и различными способами.

Статистическая оценка достоверности RAPD-анализа. Адекватным способом статистической оценки достоверности узлов дендрограмм или кладограмм, построенных по различным данным, в том числе RAPD, является процедура бутстрэпа. Коэффициент бутстрэпа обозначает процент деревьев, в которых рассматриваемый кластер сохраняется при проведении ресэмплинга, т.е. многократно повторяемой случайной выборки признаков из общей их совокупности. Первоначально Фельзенштейн [29] предложил считать «достоверными» узлы с 95% бутстрэпа, затем этот уровень был установлен им в 85% [38]. Вскоре стало очевидным, что это требование чересчур строгое, и узлы с бутстрэпом более 50% теперь нередко полагают хорошо поддержанным [39]. Целый ряд работ, начиная с работ Хиллиса и Булла [40], был посвящен попыткам математически обоснованного перевода статистических оценок устойчивости узлов деревьев, построенных различными методами (бутстрэп, джекнайф, коэффициент Бремера, байесовская апостериорная вероятность), в рамки 95%-ного доверительного интервала. Обычно их проводят на многократно генерируемой компьютером «эволюции» (которая, таким образом, оказывается известна), и можно отличить ошибочно реконструированные узлы от истинных. В настоящее время наиболее широко принято эмпирическое соотношение 70% бутстрэпа – 95% интервал [41]. Однако такая корреляция справедлива лишь при нормальном или близком к нему распределении переменных, используемых при компьютерном генерировании эволюции. В случае RAPD распределение дистанций не подчиняется какому-либо закону, поэтому количественное сопоставление с доверительным интервалом представляется нам некорректным. Кроме того, работая в течение многих лет с различными ДНК-фingerprintами, мы располагаем эмпирическими наблюдениями о несколько заниженном значении коэффициента бутстрэпа для одних и тех же сравниваемых групп при RAPD-анализе по сравнению, например, с AFLP или RFLP (полиморфизм амплификационных или рестрикционных фрагментов). В данной работе мы рассматриваем как

поддержанные те узлы, которые воспроизводятся при различных способах конструирования дерева, даже если их индексы бутстрэпа несколько менее 50%.

Генетические связи популяций мальмы Курильских о-вов. На северных Курильских островах обитают в основном некрупные пролупроходные гольцы, не уходящие далеко в море, а для южных Курильских островов проходные формы до недавних пор вообще не были описаны [17]. Отсутствие типичных проходных форм должно затруднять обмен генами популяциями [13]. С другой стороны, сообщается о находках в пределах ареала южной мальмы единичных проходных особей северной мальмы [42] и изредка встречающемся на о. Кунашир северном варианте мтДНК [43]. Это позволило свойственную курильским гольцам клинальную изменчивость по меристическим признакам объяснять интрогрессивной гибридизацией [12, 17]. Учитывая малочисленность островных популяций, нельзя исключить влияния на их генофонд даже небольшой миграции. Таким образом, в настоящее время данные о статусе популяций гольцов Курильских о-вов достаточно противоречивы.

Одним из важных результатов этой работы следует считать экспериментальное доказательство заметной генетической дивергенции гольцов, обитающих на различных о-вах Курильской гряды. Этот факт, вполне закономерный для жилых изолятов, был показан также для проходных рыб. Являясь в пределах каждого острова проходными, гольцы, рассматриваемые в пределах всей Курильской гряды, по существу представляют собой островные изоляты, причем жилые и проходные формы образуют единые группы генотипов. В пределах острова, как правило, выделяются субпопуляции отдельных жилых форм.

Генетическая изолированность мальмы отдельных островов может быть теоретически связана с двумя различными причинами: генетическим дрейфом в островных популяциях, сохранявшихся в изолированных рефугиумах с доледниковых времен [3, 5], либо «эффектом основателя» – заселением островов отдельными экземплярами проходных рыб, что должно приводить к выборочному смещению частот аллелей [21]. Ранее о генетической изолированности мальмы отдельных островов сообщали Омельченко с соавт. [21], но при этом не была обнаружена какая-либо связь между генетическим сходством и географическими расстояниями между популяциями. В настоящей работе различными методами показана достоверная близость мальмы северных Курильских островов

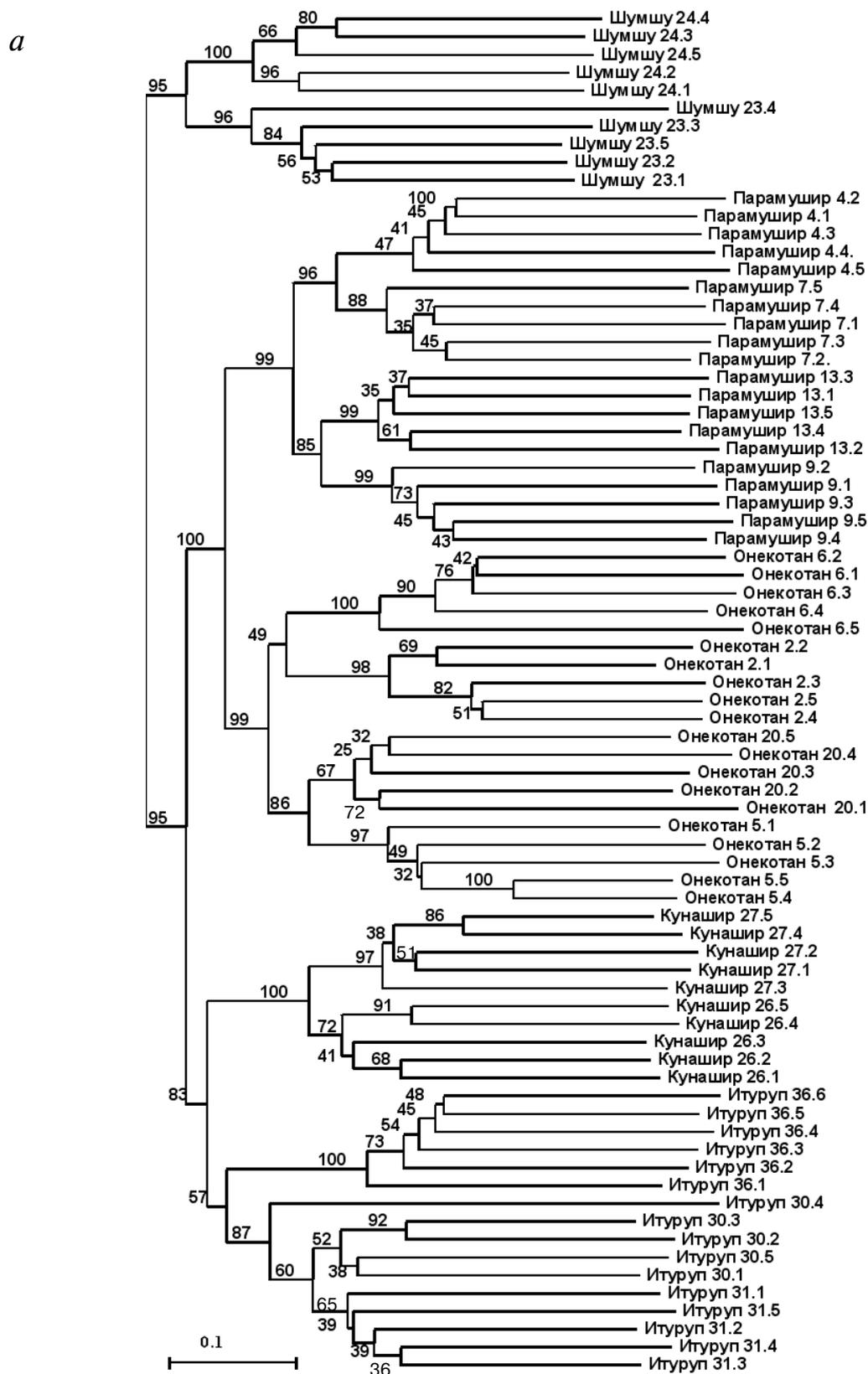
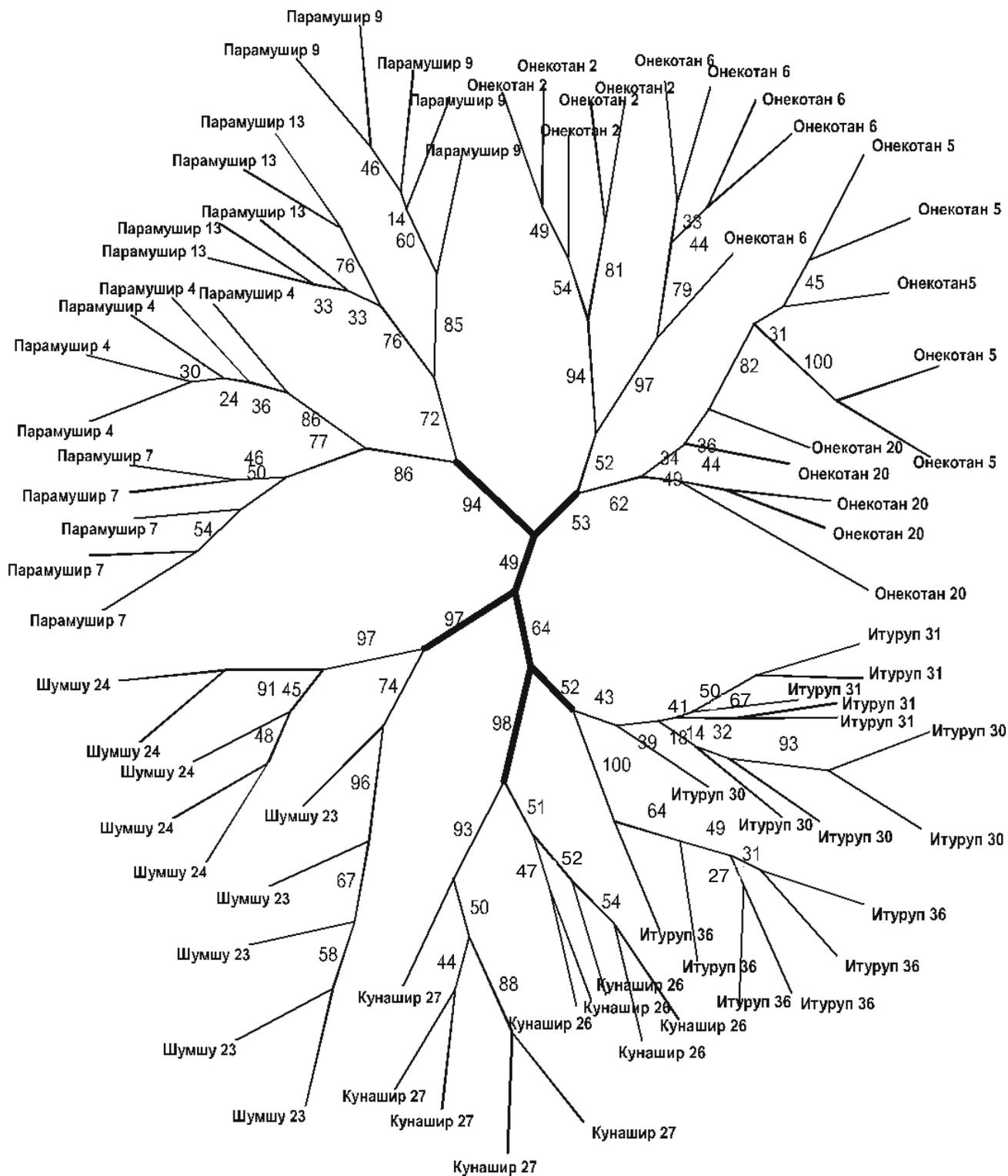


Рис. 4. Суммарные неукорененные деревья жилых форм мальмы Курильских о-вов. Обозначения как на рис. 3. В анализе участвовал 731 признак. Дендрограмма NJ на основе генетических дистанций Неи и Ли (*a*). Немасштабированное МР-дерево на основе парсимонии Вагнера (*b*). Индексы бутстрэпа представлены полностью

б



Окончание рис. 4

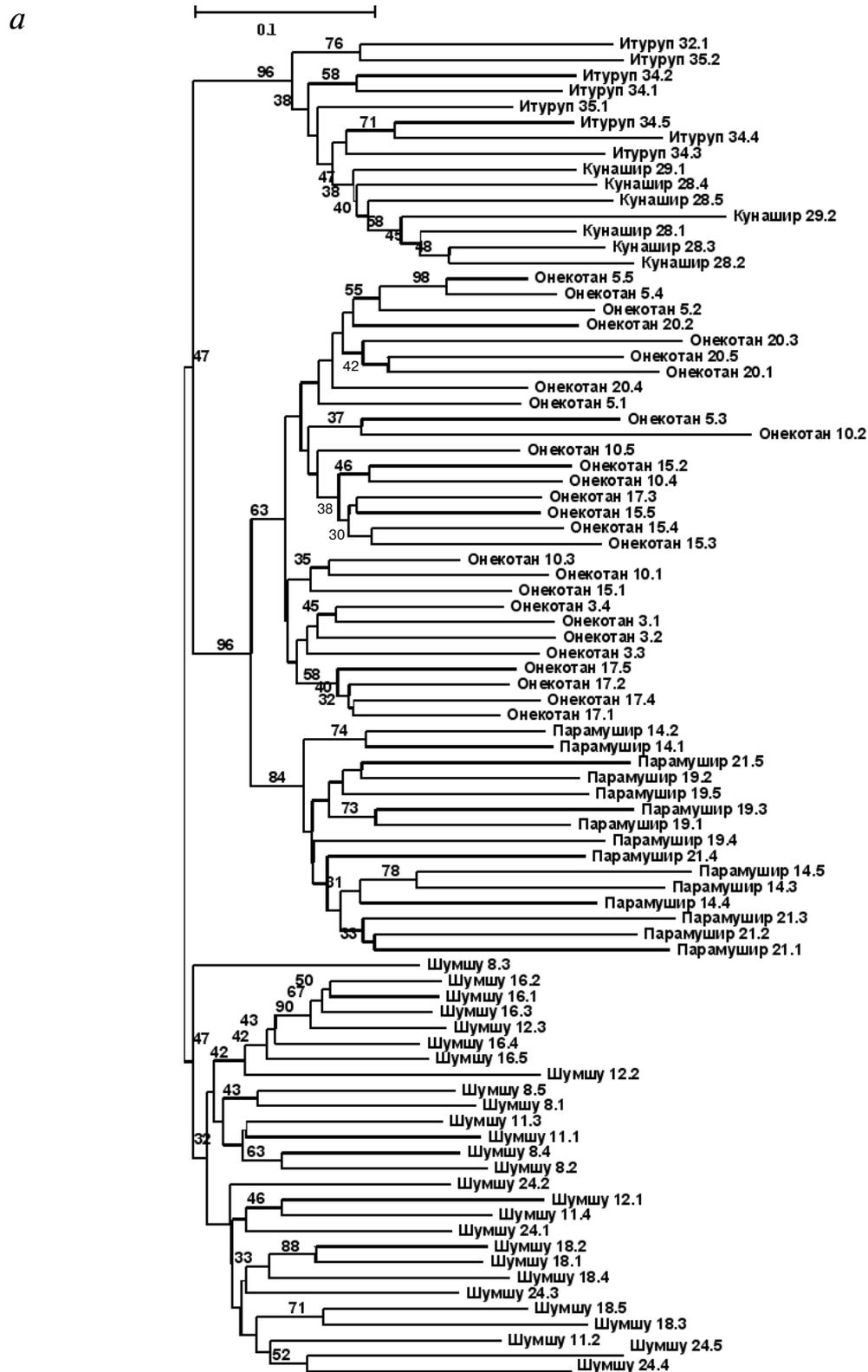
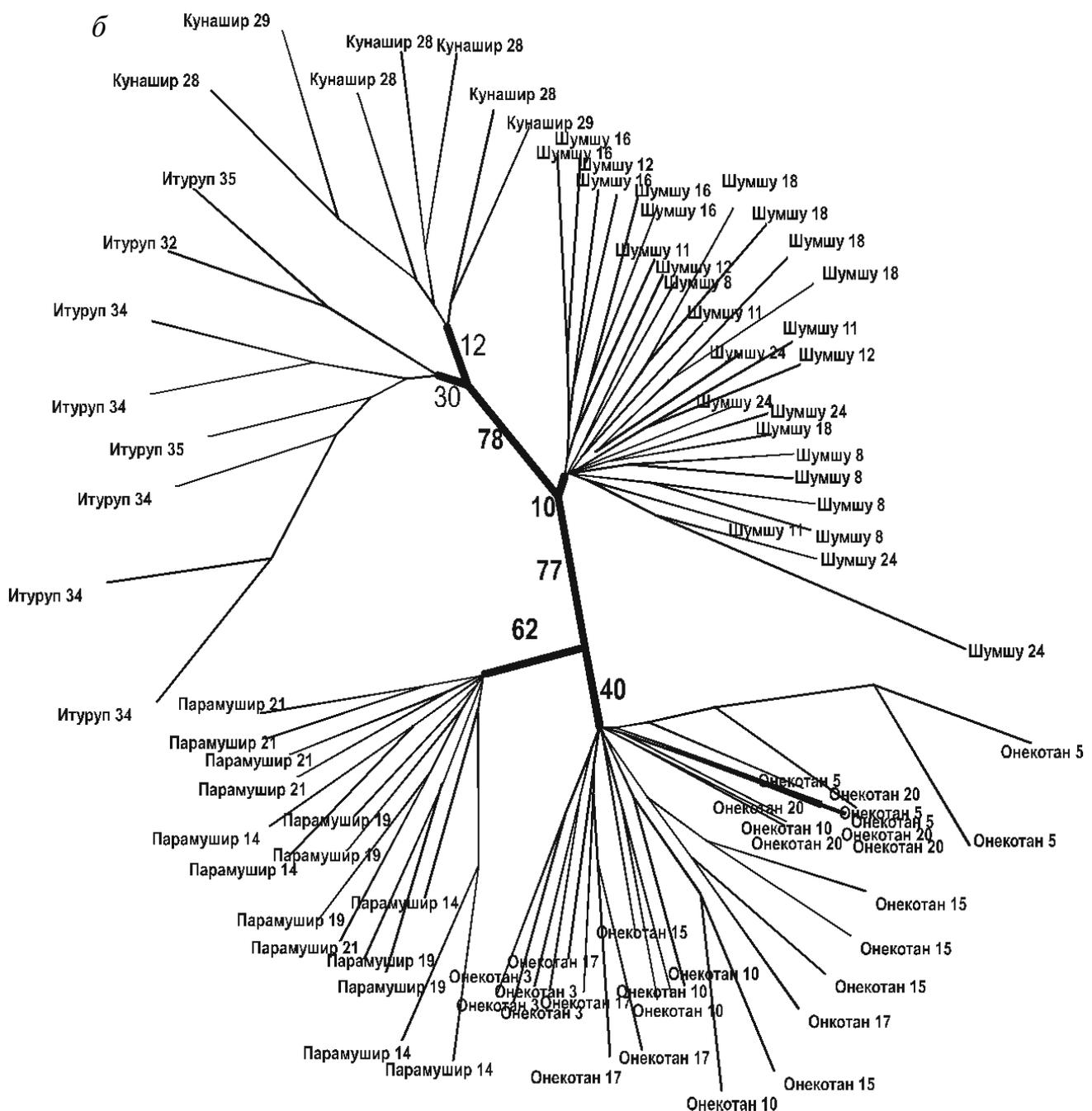


Рис. 5. Суммарные неукорененные деревья проходных форм мальмы Курильских островов. Анализировалось 340 признаков. Дистанционная дендрограмма NJ (*a*). Обозначения как на рис. 3. Немасштабированное МР-дерево на основе парсимонии Долло. Обозначены номера выборок. Коэффициенты бутстрапа проставлены только для основных кластеров (*б*)



Окончание рис. 5

(о. Парамушир и о. Онекотан) и мальмы южных Курильских островов (о. Итуруп и о. Кунашир), объединяющихся в два суперкластера. Мы связываем это различие с большим числом признаков (до 740), проанализированных в настоящей работе, по сравнению с работой Омельченко с соавт. (51 аллель для 20 полиморфных локусов).

Наши данные позволяют исключить дрейф или эффект основателя в чистом виде и показывают влияние ограниченного потока генов между соседними островами. В наш анализ включены одновременно и жилые, и проходных формы, это позволяет внести некоторую определенность в данный вопрос, как будет показано ниже.

Отдельные выборки проходных форм в пределах острова, как правило, не формировали устойчивых кластеров. Это согласуется с описанным для южной мальмы нестрогим хомингом [44]. Наши данные указывают, что миграции проходных гольцов имеют место не только в пределах острова, но и между островами: поддержка кластеров проходных форм, соответствующих островам, наблюдалась на меньшем уровне статистической значимости (рис. 4, а, б; рис. 5, а, б). Если бы миграции проходных рыб между островами не происходило, они были бы обособлены в той же мере, как и жилые формы. Однако интенсивность потока генов между островами не столь сильна, чтобы объединить их в единый генетический пул.

По крайней мере, на о. Парамушир и о. Онекотан, жилые формы, обитающие в разных географических точках островов, оказываются генетически ближе друг к другу, чем к проходным формам соседних или даже одних и тех же водных систем. Это позволяет предположить, что они представляют как бы жилое ядро гольцов острова — потомков либо прегляциональных реликтов, либо более ранних вселенцев на острова (эти две возможности здесь неразличимы), с которыми постоянно смешиваются иммигранты, пополняющие пул проходных гольцов острова. Смешивание проходных и жилых форм в рамках единой водной системы мы наблюдаем на примере ручья Фонтанка (рис. 3, б). Если сравнить статистическую поддержку жилой выборки ручья Фонтанка в составе объединенной островной, суммарной жилой и суммарной проходной (куда она также включена) выборки (рис. 3, б, 4, а, б), то очевидно, что происходит ее смешивание и с другими проходными гольцами острова (по-видимому, опосредованное популяцией проходной формы ручья). Проходные иммигранты способны создать вторичные жилые формы, как в оз. Большое Черное на о. Парамушир (рис. 3, а). На о. Кунашир и о. Итуруп, где проходные формы более редки, подразделения на «жилое ядро» и «проходную оболочку» не наблюдается: очевидно, смешивание происходит в рамках многих водных систем этих островов.

На фоне остальных Курильских островов выделяется о. Шумшу. По генетическим расстояниям и топологии деревьев гольцы о. Шумшу формируют отдельный кластер, равноценный

кластерам северных и южных Курильских островов. Дополнительной особенностью о. Шумшу является разделение проходных формы гольцов на несколько изолированных групп (рис. 3, г). Генетическая дифференциация проходной мальмы о. Шумшу может быть связана с перекрыванием ареалов двух форм *S. alpinus malma* и *S. alpinus krasheninnikovi* [13]. Омельченко с соавт. [21] сделали вывод о присутствии на о. Шумшу северной формы на основании смещения распределения частот аллелей аллозимных локусов. Об этом же свидетельствует данные по мтДНК [12]. В настоящей работе это предположение не может быть проверено ввиду отсутствия выборки северной мальмы.

ПЦР-RAPD-анализ геномной ДНК различных жилых и проходных форм *Salvelinus alpinus krasheninnikovi* Tarenetz из водоемов Курильских островов показал строгую корреляцию между генетической структурой и географической локализацией популяций. Продемонстрировано более тесное генетическое единство различных форм мальмы, относящихся к водной системе одного острова, нежели сходных экологических форм разных островов. Выборки с пяти островов формируют пять поддержанных кластеров, которые в свою очередь объединяются в три суперкластера: о. Парамушир с о. Онекотан; о. Итуруп с о. Кунашир; о. Шумшу. Обнаружена генетическая неоднородность мальмы о. Шумшу. Этот факт предположительно расценивается как свидетельство возможного перекрывания (в настоящем или прошедшем времени) ареалов южной и северной форм мальмы.

Работа выполнена при финансовой поддержке ВНИРО и РФФИ (гранты 01-04-48613 и 00-15-97905).

Авторы благодарят В.М. Стыгара, А.К. Грузевича, Е.В. Ведищеву (ВНИРО) и сотрудника кафедры ихтиологии МГУ М.Ю. Пичугина за сбор материала, а также К.А. Савваитову за интерес к работе и ценные консультации. Мы приносим благодарность А.К. Грузевичу за выполнение схематической карты сбора материала. Статью, как и весь номер журнала (прим. редактора), было бы невозможно представить себе без обсуждения и совместной работы над окончательной редакцией текста с В.В. Алешиним.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Savvaitova, K.A. (1995) *Nordic J. Freshw. Res.*, **71**, 81–91.
2. Шубина Е.А., Пономарева Е.В., Гриценко О.Ф. (2006) *Журн. общ. биол.*, **67**, 298–310.
3. Таранец А.Я. (1936) *Тр. Зоол. ин-та АН СССР*, **IV**, 483–537.
4. Берг Л.С. (1948) *Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран*. Ч. 1. Изд-во АН СССР, Москва–Ленинград.

5. Гриценко О.Ф. (1975) *Тр. ВНИИ рыб. хоз-ва и океанографии*, **106**, 141–160.
6. Behnke, R.J. (1984) in: *Biology of the Arctic charr* (Johnson, L., and Burns, B.L., eds), Univ. Manitoba Press, Winnipeg, pp. 3–21.
7. Oleinik, A.G., Skurikhina, L.A., Frolov, S.A., Brykov, V.A., and Chereshev, I.A. (2004) *Environment. Biol. Fish.*, **69**, 449–459.
8. Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков В.А., Крэйл П.А., Венбург Дж.К. (2005) *Генетика*, **41**, 626–634.
9. Phillips, R., Gudex, L., Westrich, K., and DeCicco, A. (1999) *Canad. Journ. Fish. Aquat. Sci.*, **56**, 1504–1511.
10. Salmenkova, E.A., Omelchenko, V.T., Kolesnikov, A.A., and Malinina, T.V. (2000) *J. Fish Biol.*, **57** (Suppl A), 136–157.
11. Behnke, R.J. (1989) *Physiol. Ecol. Jap. Spec.*, **1**, 35–48.
12. Шедько С.В., Гинатулина Л.К., Мирошниченко И.Л., Немкова Г.А. (2007) *Генетика*, **43**, 227–239.
13. Гриценко О.Ф., Савваитова К.А., Груздева М.А., Кузищин К.В. (1998) *Вопр. ихтиологии*, **38**, 189–198.
14. Гриценко О.Ф., Савваитова К.А., Груздева М.А., Кузищин К.В. (1999) *Вопр. ихтиологии*, **39**, 190–196.
15. Гриценко О.Ф., Пичугин М.Ю., Демьянов Т.В. (2002) *Вопр. ихтиологии*, **42**, 314–321.
16. Савваитова К.А., Груздева М.А., Кузищин К.В., Стыгар В.М. (2001) *Вопр. ихтиологии*, **41**, 5–18.
17. Шедько С.В. (2002). В кн.: *Растительный и животный мир Курильских о-вов (материалы Международного Курильского проекта)*. Дальнаука, Владивосток, с. 118–134.
18. Пичугин М.Ю., Сидоров Л.К., Гриценко О.Ф. (2006) *Вопр. ихтиологии*, **46**, 224–239.
19. Савваитова К.А., Гриценко О.Ф., Груздева М.А., Кузищин К.В. (2000) *Вопр. ихтиологии*, **40**, 743–763.
20. Савваитова К.А., Груздева М.А., Кузищин К.В., Гриценко О.Ф., Стыгар В.М. (2004) *Вопр. ихтиологии*, **44**, 89–101.
21. Омельченко В.Т., Салменкова Е.А., Шедько С.В. (2002) *Генетика*, **38**, 1259–1269.
22. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) *Nucleic Acid Res.*, **18**, 6531–6535.
23. Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1993) *Methods Enzymol.*, **218**, 704–740.
24. Welsh, I., and McClelland, M. (1991) *Nucleic Acid Res.*, **19**, 5275–5279.
25. Von Beroldingen, C.H., Blake, E.T., Higuchi, R., Sensabaugh, G.F., and Erlich, H. (1989) in: *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (Erlich, H.A., ed.), Stockton Press, New-York, pp. 209–223.
26. Saitou, N., and Nei, M. (1987) *Mol. Biol. Evolution*, **4**, 406–425.
27. Nei, M., and Li, W.-H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5269–5273.
28. Van de Peer, Y., and de Wachter, R. (1994) *Comput. Applic. Biosci.*, **10**, 569–570.
29. Felsenstein, J. (1985) *Evolution*, **39**, 783–791.
30. Глубоковский М.К. (1995). *Эволюционная биология лососевых рыб*. Наука, Москва.
31. Никифоров С.Н., Макеев С.С., Беловолов В.Ф. (1993) *Вопр. ихтиологии*, **33**, 500–510.
32. Lynch, M., and Milligan, B.G. (1994) *Mol. Ecol.*, **3**, 91–99.
33. Zhivotovsky, L.A. (1999) *Mol. Ecol.*, **8**, 907–913.
34. Reiseberg, L.H. (1996) *Mol. Ecol.*, **5**, 99–105.
35. Wu, J., Krutovskii, K.V., and Strauss, S.H. (1999) *Genome*, **42**, 893–908.
36. Ferguson, M.M., and Danzmann, R.G. (1998) *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **55**, 1553–1563.
37. Sliva, E.P., and Russo, A.M. (2000) *Hydrobiologia*, **420**, 119–135.
38. Felsenstein, J., and Kishino, H. (1993) *Syst. Biol.*, **42**, 193–200.
39. Marvaldi, A.E., Sequeira, A.S., O'Brien, C.W., and Farelli, B.D. (2002) *Syst. Biol.*, **51**, 761–785.
40. Hillis, D.M., and Bull, J.J. (1993) *Syst. Biol.*, **42**, 182–192.
41. Zander, R.H. (2004) *Phyloinformatics*, **2**, 1–13.
42. Ishigaki, K. (1969) *Bull. Biogeogr. Soc. Japan*, **24**, 37–43.
43. Ginatulina, L.K., Shedko, S.V., Ginatulin, A.A., Miroshnichenko, I.L. (2000) in: *Biodiversity and dynamics of ecosystems in North Eurasia*. Vol. 1, Part 3. IC&G, Novosibirsk, pp. 40–41.
44. Armstrong, R.H., and Morrow, J.E. (1980) in: *Charrs: Salmonid fishes of the genus Salvelinus* (Balon, E.K., ed.), Dr. W. Junk Publ., Hague, pp. 99–140.

POPULATION GENETICS STRUCTURE OF *Salvelinus* CHARR FROM KURIL ISLANDS

E. A. Shubina¹, E. V. Ponomareva¹, O. F. Gritzenko²

¹ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

² Federal Institute of Fishery and Oceanography,
ul. Verhnayay Krasnosel'skaya, Moscow 107140, Russia

Received September 4, 2007

PCR-RAPD was used to study the genetic structure of malma *Salvelinus alpinus krasheninnikovi* (*Salvelinus malma krasheninnikovi*) collected from 35 localities from five Kuril Islands – Shumshu, Paramushir, Onkotan, Iturup, and Kunashir. The resident as well as anadromous salmonids from each island formed clusters that were significantly distinct from samples belonging to the other islands. The samples from five islands combine into three major clusters: Kunashir Island plus Iturup Island, Paramushir Island plus Onkotan Island, and Shumshu Island. The possible reasons for genetic similarity of anadromous and resident forms of charr that inhabit discrete islands are under consideration: the founder effect, homing, limited migration.

Key words: PCR-RAPD, Dolly Varden charr, Kuril Islands, cluster analysis