

На правах рукописи

МАЛЯР ВАСИЛИЙ ВАСИЛЬЕВИЧ

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФИЛОГЕОГРАФИЯ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ РЫБ СЕМЕЙСТВ  
SALMONIDAE И CYPRINIDAE В ЯПОНСКОМ И ОХОТСКОМ МОРЯХ**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
«Национальный научный центр морской биологии»  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор **Брыков Владимир Алексеевич**

**Официальные оппоненты:**

**Радченко Ольга Аркадьевна**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, директор

**Семенченко Александр Анатольевич**, кандидат биологических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет», старший преподаватель кафедры биоразнообразия и морских биоресурсов

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита диссертации состоится « 3 » апреля 2018 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу:  
690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423) 2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения Российской академии наук:  
<http://wwwwimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovets-d-005-008-01/38-malyar-vasilij-vasilevich>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, кандидат биологических наук

*Ващенко*

Ващенко Марина  
Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Определение исторических и экологических факторов в процессах формирования внутривидовых единиц и образования новых видов является одной из наиболее важных проблем в эволюционной биологии по многим причинам (Maug, 1963). Во-первых, сравнительный анализ генетической изменчивости внутри близких видов в пределах географического региона позволяет определить время дивергенции основных генеалогических линий и выявить наиболее существенные факторы, которые влияли на популяционно-генетическую структуру видов в прошлом. Во-вторых, точные данные о характере влияния палеоклиматических изменений на генетическую структуру могут быть использованы для прогнозирования последствий современных климатических флуктуаций, включая характер и скорость колонизации новых доступных мест обитания (Avice, 2000). И, наконец, определение границ популяций имеет большое практическое значение, поскольку популяции являются единицами хозяйственной деятельности человека. Использование данных о внутривидовой изменчивости при искусственном разведении, интенсивном промысле видов или организации мер по их сохранению способствует устойчивости экологической и генетической структуры популяций и позволяет поддерживать их численность на высоком уровне (Иванков, Иванкова, 2015).

В северной Пацифике осцилляции климата на протяжении последних нескольких миллионов лет оказали существенное влияние на эволюцию видов и формирование внутривидовой структуры не только у наземных животных, но и у пресноводных и морских рыб (Avice, 2000). В периоды похолоданий формировались ледниковые щиты, существенно снижался уровень океана, большинство видов вытеснялось в южные регионы, где могли сохраняться в рефугиумах, из которых виды распространялись на север, когда ледники отступали и уровень океана вновь восстанавливался. Формирование двух и более рефугиумов приводило к изоляции особей, снижению или полному прекращению генетического обмена между популяциями. В случае нескольких рефугиумов вероятность дивергенции изолированных форм и образования двух или более видов увеличивалась. Исторические факторы (фрагментация, экспансия, реколонизация), сопровождавшие изменения ареалов видов под влиянием циклических колебаний климата, также существенно влияли на распределение генетической изменчивости внутри видов (Templeton et al., 1995).

Постепенное снижение использования анализа аллозимной изменчивости и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и повсеместное внедрение современных методов получения нуклеотидных последовательностей ДНК определили более высокий уровень научных работ по внутривидовой изменчивости, географическому распространению и истории становления и эволюции ихтиофауны данного региона. Появление филогеографических подходов на основе молекулярно-генетического анализа митохондриальной ДНК и доступность технологий секвенирования позволяет с высокой точностью реконструировать события дивергентной эволюции внутри видов и групп видов и отнести их к тому или иному историческому периоду. Это обусловлено тем, что гипотеза «молекулярных часов» предполагает равномерное накопление нуклеотидных замен во времени и во многих случаях это положение подтверждается экспериментально (Avice, 2000).

Благодаря своим свойствам (материнское наследование, быстрая эволюция и отсутствие рекомбинаций) митохондриальная ДНК представляет собой очень удобный маркер для эволюционного и популяционного анализа (Brown et al., 1979). Прекращение генетического обмена между популяциями приводит к появлению различий в мтДНК особей из разных

популяций в результате накопления мутаций и стохастических процессов. При длительном независимом существовании популяций во времени в них формируются различающиеся филогруппы мтДНК. Именно поэтому анализ изменчивости мтДНК стал своеобразным стандартом при изучении путей и механизмов формирования видов и внутривидовых единиц (Templeton et al., 1995; Avise, 2000).

**Степень разработанности темы.** Исследованию внутривидовой дивергенции пресноводных и морских видов рыб северо-западной Пацифики посвящено много работ (Брыков и др., 2010; Олейник и др., 2007; Горбачев и др., 2014; Шедько и др., 2015; Yu et al., 2010; Shen et al., 2011; Liu et al., 2011).

Многолетние исследования внутривидовой изменчивости кеты в регионе осуществлены с использованием анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (Брыков и др., 2000; Churikov et al., 2001; Брыков и др., 2003; Полякова и др., 2006) и микросателлитных ДНК-маркеров (Beacham et al., 2008). Сравнительно небольшое количество работ данного направления основано на анализе нуклеотидных последовательностей мтДНК (Yoon et al., 2008; Савин и др., 2009; Бачевская, Переверзева, 2010).

Генетическая изменчивость дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* также изучены только с применением устаревших подходов на основе ПДРФ-анализа (Брыков и др., 2011; Брыков и др., 2013; Семина и др., 2006; Семина и др., 2007; Рязанова, Полякова, 2012) и изменчивости аллозимов (Sakai et al., 2002).

Работ по морфологическим и биологическим характеристикам, экологии и поведению сахалинского тайменя достаточно для того, чтобы в некоторой степени получить представление о данном виде и амплитуде внутривидовых колебаний указанных признаков. В тоже время, исследования, освещающие внутривидовую генетическую изменчивость вида, единичны и ограничиваются использованием анализа микросателлитных маркеров (Шитова и др., 2012; Zhivotovsky et al., 2015). Отчасти это объясняется краснокнижным статусом вида и, следовательно, ограниченностью доступности материала.

Виды были выбраны исходя из того, что все они являются проходными, имеющими как морской период в жизненном цикле, так и пресноводный, связанный с размножением (все виды), а также зимовкой (красноперки). Три из четырех исследуемых видов, сахалинский таймень и красноперки рода *Tribolodon*, являются эндемиками этого региона. Кета распространена во всей северной Пацифике, однако некоторые данные дают основания полагать, что центром происхождения этого вида является Японское море (Yoon et al., 2008; Полякова и др., 2006). Сравнительные исследования с привлечением новых филогеографических методов и детальным описанием эволюционной истории региональных популяций указанных видов Японского побережья и о. Сахалин до настоящего времени не проводились.

**Цель и задачи исследования.** Цель данной работы – исследование распределения внутривидовой генетической изменчивости митохондриальной ДНК у четырех видов рыб семейств Salmonidae (сахалинского тайменя и кеты) и Cyprinidae (крупночешуйной и мелкочешуйной красноперок) в Японском и Охотском морях.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить нуклеотидные последовательности фрагментов генов *COI* и *cytb* мтДНК кеты *Oncorhynchus keta*, сахалинского тайменя *Parahucho perryi*, крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis* и мелкочешуйной красноперки *Tribolodon brandtii*;
2. Проанализировать особенности пространственного распределения генеалогических групп исследуемых видов;

3. Реконструировать демографическую историю видов на основе данных о генетическом полиморфизме;
4. Определить время дивергенции основных внутривидовых единиц;
5. Проанализировать биологические особенности и влияние палеоклиматических факторов на демографическую историю каждого вида;

**Научная новизна.** В работе впервые исследована внутривидовая генетическая изменчивость эндемичных видов краснопёрок (*Tribolodon hakonensis*, *Tribolodon brandtii*) и сахалинского тайменя (*Parahucho perryi*) на основе первичных нуклеотидных последовательностей генов мтДНК *COI* и *cytb*. Установлены последовательность и время формирования основных эволюционных линий сахалинского тайменя, кеты, крупночешуйной и мелкочешуйной краснопёрок Японского и Охотского морей. Результаты молекулярной датировки внутривидовой дифференциации сопоставлены с палеоклиматической летописью региона северо-западной Пацифики. Кроме того, впервые осуществлена реконструкция демографической истории популяций видов рыб семейства Salmonidae и Cyprinidae.

**Теоретическое и практическое значение работы.** С помощью современных методов анализа молекулярно-генетических данных настоящая работа внесет значительный вклад в исследования сравнительной филогеографии лососевых и карповых рыб, занимающих общий предковый ареал. Во время исследования определены и депонированы в международную базу данных GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA) 258 новых нуклеотидных последовательностей генов *COI* и *cytb* митохондриальной ДНК кеты, сахалинского тайменя, крупночешуйной и мелкочешуйной краснопёрки. Результаты проведенной работы послужат основой для дальнейших исследований эволюционной истории видов всей ихтиофауны северо-западной Пацифики, подчеркивая уникальность данного региона.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В данной диссертационной работе применены современные молекулярно-генетические методы. Амплификацию выбранных фрагментов ДНК осуществляли с помощью ПЦР. Получение первичных нуклеотидных последовательностей проводили по методу Сэнгера. Анализ полученных данных реализован с помощью специализированного программного обеспечения. Филогенетические деревья реконструированы с использованием метода максимального правдоподобия (ML), метода ближайшего связывания (NJ) и байесовского подхода (BI) в программах MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011) и BEAST 1.8.0 (Drummond et al., 2012). Пространственные закономерности в распределении гаплотипов мтДНК визуализированы с помощью медианных сетей (Bandelt et al., 1999). Молекулярная датировка дивергенции внутривидовых эволюционных линий у исследованных таксонов проведена на основе байесовского подхода в пакете программ BEAST 1.8.0 (Drummond et al., 2012). Для реконструкции демографической истории популяций в работе задействованы методы коалесцентного анализа. Выбор основных параметров построения байесовских контурных диаграмм производили при попарном сравнении значений функции максимального правдоподобия (log Bayes factor) (Suchard et al., 2001). Все вычисления с использованием байесовского подхода были произведены на базе высокопроизводительного интернет-ресурса CIPRES (Miller et al., 2010).

**Личный вклад автора.** Экспериментальная часть молекулярно-генетических исследований и обработка полученных данных были выполнены автором в полном объеме. Самостоятельно освоены различные программы для филогенетической обработки данных в рамках исследования. Автор принимал участие в представлении результатов исследования на конференциях и подготовке материалов для публикаций.

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

1. Популяции видов *Parahucho perryi*, *Oncorhynchus keta*, *Tribolodon hakonensis* и *Tribolodon brandtii* демонстрируют сходные закономерности образования материковых и островных филогрупп гаплотипов, в значительной степени синхронизированных по времени.
2. Обнаруженные генетические различия популяций видов с материкового побережья Японского моря и о. Сахалин связаны с их продолжительной изоляцией под воздействием колебаний среды в процессе смены ледниковых и межледниковых периодов эпохи плейстоцена.
3. Исследование демографической истории популяций видов северо-западной части Пацифики на основании полиморфизма генов мтДНК выявил недавний период резкого увеличения численности, связанного с окончанием последнего ледникового максимума.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов обеспечена современными молекулярно-генетическими и филогеографическими подходами, в том числе применением методов коалесценции и статистической обработки информации, которые соответствуют целям и задачам, поставленным в работе. Использование одних и тех же алгоритмов, и методов анализа данных с помощью разного программного обеспечения, а также повтор результатов при дополнительных экспериментах, позволили всесторонне проанализировать полученные данные и определили точность реконструкций демографических и дивергентных событий. Анализ результатов исследования, научных положений и выводов подкреплен данными, приведенными в таблицах и рисунках.

**Апробация результатов работы.** Результаты работы были представлены на ежегодной научной конференции Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток (2013); I межрегиональной молодежной школе-конференции «Актуальные проблемы биологических наук», г. Владивосток (2013); II международной научной конференции «Современные проблемы биологической эволюции», г. Москва (2014); 4-й Московской международной конференции «Молекулярная филогенетика MolPhy-4», г. Москва (2014).

**Публикации.** По теме диссертации опубликованы 5 работ, в том числе 2 статьи в журналах из списка ВАК.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 157 страницах, содержит 16 таблиц и 19 рисунков. Материалы работы представлены в виде общего введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», а также «Заключения», «Выводов», «Списка литературы» и 13 приложений. Список литературы содержит 302 источника, из них 236 на иностранном языке.

**Благодарности.** Выражаю глубокую признательность своему научному руководителю профессору, д.б.н. Брыкову Владимиру Алексеевичу за всестороннюю помощь, опытное руководство и поддержку на протяжении всех лет работы в лаборатории. Особую благодарность выражаю рецензенту д.б.н., ст. н. с. Олейник Алле Геннадьевне за ознакомление с текстом рукописи, рекомендации и справедливые замечания. Выражаю искреннюю благодарность коллективу лаборатории генетики за сотрудничество в написании совместных статей и всестороннюю поддержку, в частности к.х.н., ст.н.с. Кухлевского Андрея Даниловича за ценные наставления и советы при использовании молекулярно-генетических методов и к.б.н., н.с. Шарину Светлану Николаевну за предварительное ознакомление с текстом диссертационной работы и важные замечания. Глубокую признательность выражаю своим родным и близким за всестороннюю и неоценимую поддержку.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой подглаве кратко приведены данные о географическом распространении, биологических и экологических особенностях и современном состоянии исследуемых таксонов: кеты, сахалинского тайменя, крупночешуйной и мелкочешуйной красноперок в составе рода *Tribolodon*. Кроме того, отмечены методологические аспекты основных генетических исследований по каждому виду. В следующей подглаве сформулирована концепция филогеографии, приведены основные методы и молекулярные маркеры в данной области и обозначены преимущества использования маркеров мтДНК. Далее выделены особенности филогеографии морских и пресноводных видов рыб с примерами соответствующих исследований. Отдельной подглавой изложена гипотеза молекулярных часов, как один из классических подходов для оценки скорости и времени дивергенции. Также обозначены существующие способы калибровки молекулярных часов и проблемы установления времени дивергенции при использовании данной гипотезы, приведены литературные данные о скорости эволюции ДНК исследуемых групп рыб. В заключительной подглаве рассмотрен современный метод байесовских контурных диаграмм для ретроспективного изучения демографической истории популяций на основе теории коалесценции, его преимущества и основные ограничения.

### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**2.1. Материалы исследования.** Материалом для исследования послужили выборки четырех видов рыб из семейств Salmonidae (кета и сахалинский таймень) и Cyprinidae (крупночешуйная и мелкочешуйная красноперки) из рек бассейнов материкового побережья Японского моря и о. Сахалин. Кета *Oncorhynchus keta*: р. Нарва (10 экз.), р. Киевка (10 экз.), р. Найба (10 экз.); сахалинский таймень *Parahucho perryi*: р. Киевка (6 экз.), р. Максимовка (3 экз.), р. Тумнин (26 экз.), зал. Набильский (5 экз.), р. Леонидовка (4 экз.), оз. Айнское (16 экз.); мелкочешуйная красноперка *Tribolodon brandtii*: зал. Восток (12 экз.), оз. Тунайча (8 экз.); крупночешуйная красноперка *Tribolodon hakonensis*: зал. Восток (9 экз.), р. Ильинка (10 экз.).

**2.2. Выделение ДНК.** Геномную ДНК выделяли по стандартной методике (Маниатис и др., 1984; Sambrook et al., 1989) с небольшими модификациями, состоящими в удалении фенола из протокола и добавлении рибонуклеазы. После выделения ДНК проверяли ее качество и оценивали количество полученного материала с помощью электрофореза в агарозном геле.

**2.3. ПЦР.** Для амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) гена *COI* использовали праймеры COI-FishF1/R1 (Ward et al., 2005). Ген *cytb* амплифицировали, используя пары праймеров Fishcytb-F/Truccytb-R, THR-Fish-R, THR-Fish2-R (Sevilla et al., 2007). Полученные амплифицированные образцы осаждали и последовательно очищали с использованием этанола.

**2.4. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК.** Получение первичных последовательностей фрагментов генов *COI* и *cytb* проводили с использованием ген-специфических праймеров и набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Полученные продукты ПЦР очищали от не включенных флуоресцентных меток. Капиллярный электрофорез проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130 и 3500 (Applied Biosystems, США) на базе Национального научного центра морской биологии ДВО РАН и ABI Prism 3130x1 на базе Дальневосточного Федерального Университета.

**2.5. Редактирование и выравнивание последовательностей.** Хроматограммы прямых и обратных последовательностей проверяли на наличие ошибок и объединяли в консенсусные последовательности при помощи программ SeqScape 2.5 (Applied Biosystems), BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999), Unipro UGENE: 1.12 (Okonechnikov et al., 2012), Geneious Trial (Biomatters Limited). Множественное выравнивание осуществляли с использованием программного обеспечения MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011) по алгоритму ClustalW (Thompson et al., 1994). Размер последовательностей гена *COI* оказался 655 пн, длина фрагмента гена *cytb* кеты составила 988 пн, для сахалинского тайменя 910 пн, для крупночешуйной и мелкочешуйной красноперки 968 и 909 пн, соответственно. Оценку генетической дивергенции на основе значений нескорректированных *p*-дистанций проводили с помощью пакета MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). Подбор оптимальной модели нуклеотидного замещения осуществляли в программе jModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2012), используя байесовский информационный критерий (BIC).

**2.6. Филогенетический анализ.** Выравненные последовательности генов для каждой исследуемой особи были объединены в комбинированные последовательности. Значения гаплотипического (*h*) и нуклеотидного ( $\pi$ ) разнообразия, распределение различий между гаплотипами были рассчитаны с использованием программы DnaSP 5.10 (Librado, Rozas, 2009). Выбор модели молекулярных часов для исследуемых наборов данных производили при попарном сравнении значений функции максимального правдоподобия (log Bayes factor) (Suchard et al., 2001). Внутривидовые генеалогии и их время дивергенции были установлены с помощью байесовского подхода (BI) в пакете программ BEAST 1.8.0 (Drummond et al., 2012): «свободные» часы с некоррелированным логарифмически нормальным распределением, модель нуклеотидного замещения для последовательностей *COI* кеты – HKY+I, крупночешуйной и мелкочешуйной красноперки – HKY; *cytb* кеты – TrN, крупночешуйной красноперки – TrN, мелкочешуйной красноперки – TrN+I; для фрагментов генов сахалинского тайменя – HKY+I, длина цепи Маркова 30 млн поколений с отбором каждого тысячного состояния, значение burn-in 10%. Дополнительные филогенетические реконструкции проводили по методу NJ и ML в программе MEGA 5.05. Сети гаплотипов мтДНК визуализированы в программе SplitsTree4 4.12.3 (Huson, Bryant, 2006).

**2.7. Реконструкция демографической истории популяций.** На основе данных о внутривидовых генеалогиях с помощью программ пакета BEAST 1.8.0 построены байесовские контурные диаграммы (Bayesian skyline plot) (Drummond et al., 2005) для популяций исследуемых видов. Нижний предел скорости накопления мутаций для гена *COI* кеты составил 0,42%, для *cytb* – 0,63% за 1 млн лет, соответственно; для сахалинского тайменя зафиксирован на уровне 0,31% за 1 млн лет (Crête-Lafrenière et al., 2012); для дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* – 0,76% за 1 млн лет (Zardoya, Doadrio, 1999). Максимальная граница скорости в анализе установлена на уровне 1,7% за 1 млн лет (Stepien et al., 2000). Оптимальное количество коалесцентных групп так же было выбрано на основе значений максимального правдоподобия (log Bayes Factor) (Suchard et al., 2001). Для выборок сахалинского тайменя использовали 6 коалесцентных групп, для кеты – 10 групп, для крупночешуйной и мелкочешуйной красноперки – 8 групп.

Все вычисления с использованием байесовского подхода проводили дважды на базе высокопроизводительного кластера CIPRES (Miller et al., 2010), результаты сравнивали между собой на конвергентность. Данные независимых симуляций были объединены и визуализированы в программе Tracer 1.6.0 (Rambaut et al., 2013).



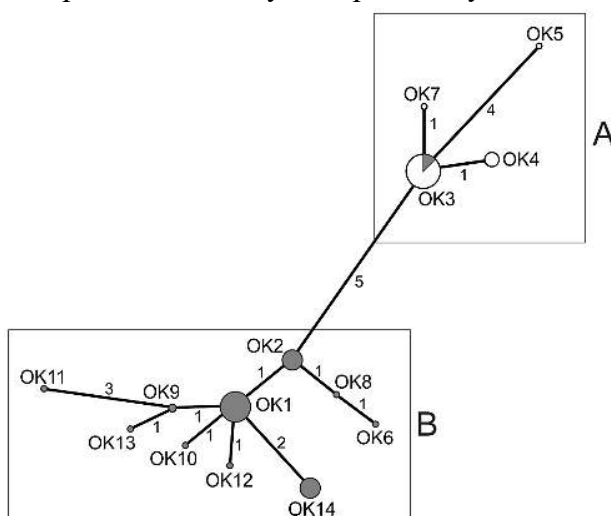
## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

**3.1. Кета *Oncorhynchus keta*.** В результате анализа нуклеотидных последовательностей у исследованных особей кеты обнаружено 14 разных гаплотипов мтДНК. Популяция кеты из р. Нарва характеризуется наибольшим количеством гаплотипов (10). В другой материковой выборке из р. Киевка насчитывается всего три гаплотипа, все с относительно высокой частотой.

Два гаплотипа (ОК1 и ОК2) являются общими с гаплотипами выборки из р. Нарва. В сахалинской популяции кеты (р. Найба) выявлены 4 гаплотипа. Наиболее часто представлен гаплотип ОК3, остальные (ОК4, ОК5 и ОК7) характерны только для данной популяции (р. Найба, о. Сахалин). Гаплотипы, обнаруженные в популяциях материковых рек Нарва и Киевка практически не перекрываются с гаплотипами из р. Найба. Исключение составляет гаплотип ОК3, выявленный в выборке из р. Найба с высокой частотой и у единственной особи в р. Нарва. Три особи из р. Киевка характеризовались уникальным гаплотипом ОК14, отмеченным только для данной популяции.

Наиболее высокие значения гаплотипической ( $1,000 \pm 0,045$ ) и нуклеотидной ( $0,00226$ ) изменчивости выявлены в выборке из р. Нарва. Меньшие значения обнаруживаются в выборках из р. Киевка,  $0,689 \pm 0,104$  и  $0,00078$  и в сахалинской популяции (р. Найба) –  $0,644 \pm 0,152$  и  $0,00083$ , соответственно.

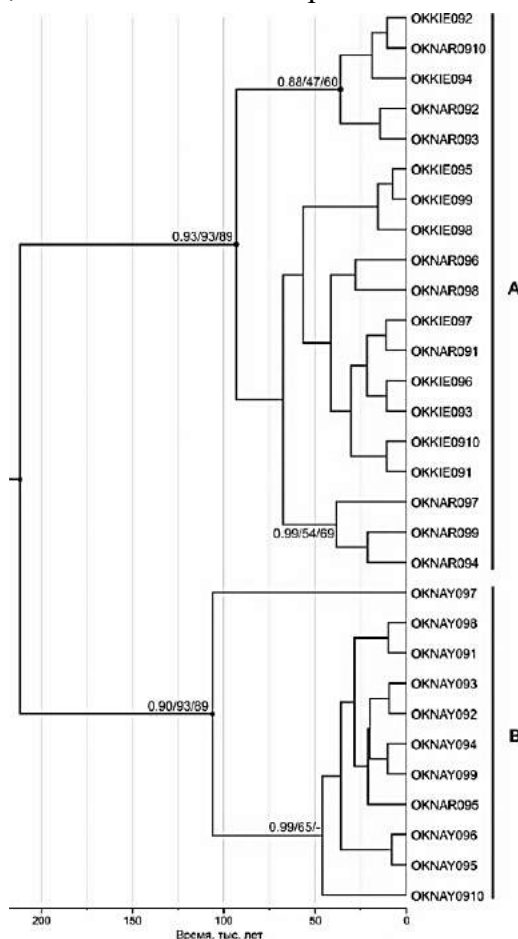
При реконструкции филогенетических отношений на основании анализа сети гаплотипов обнаружено деление исследуемых особей кеты на две группы (А и В) (Рисунок 1). Каждая выявленная филогруппа содержит по одному центральному гаплотипу (ОК1 и ОК3).



**Рисунок 1** – Генеалогическая сеть гаплотипов, полученная на основании данных анализа нуклеотидных последовательностей генов *COI* и *cytb* мтДНК *Oncorhynchus keta*. Размеры окружностей пропорциональны числу особей с указанным гаплотипом. Доля особей кеты с материкового побережья Японского моря отмечена серым цветом. На ветвях сети указано количество нуклеотидных замен между группами гаплотипов.

Остальные гаплотипы отличаются от них 1–4 нуклеотидными заменами. Все гаплотипы из филогруппы В характерны только для особей из популяций рек Нарва и Киевка. Филогруппа А пятью нуклеотидными заменами отделяется от ближайшего гаплотипа из материковой группы В и включает практически всех особей популяции кеты р. Найба (о. Сахалин). Центральные гаплотипы данных филогрупп различаются по 6 нуклеотидным заменам. Гаплотипы групп А и В формируют звездообразные структуры.

Топология филогенетических деревьев, реконструированных по комбинированным последовательностям мтДНК кеты, согласовывалась по всем использованным алгоритмам (BI, ML и NJ) (Рисунок 2). Во всех случаях анализ подтверждает наличие двух четко выраженных кластеров особей кеты с достоверным распределением относительно географических регионов. В кластер А вошли все особи кеты с материкового побережья Японского моря, в то время как кластер В объединил особей с о. Сахалин. Величины апостериорных вероятностей в узлах кластеров байесовского дерева близки к достоверным (0,90 и 0,93), в то время как ML и NJ филограммы имеют высокие показатели бутстреп-поддержки. Внутри кластеров А и В так же образуются по две субклады, часть из них достоверны только в случае байесовского дерева.

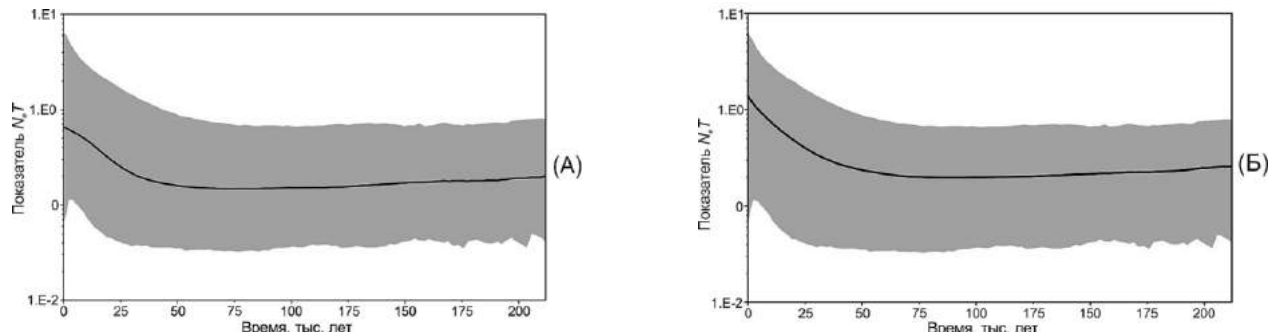


**Рисунок 2** – Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, отражающее генетическую изменчивость популяций и время дивергенции основных генеалогических линий кеты *Oncorhynchus keta* (в тыс. лет) по данным комбинированных последовательностей двух фрагментов мтДНК (*COI* и *cytb*). Достоверность ветвления основных узлов указана в виде величин апостериорных вероятностей (BI), бутстреп-индексов (% от 10000 реплик) объединения соседей (NJ) и максимального правдоподобия (ML) (PP/BP/VP).

Байесовская хронограмма с рассчитанными средними значениями времени различий указывает, что дивергенция основных групп кеты (А и В) началась около 220 тыс. лет назад с 95% интервалом наивысшей апостериорной плотности от 70 до 395 тыс. лет. Время дивергенции внутри кластеров отличается и составило в среднем 90–110 тыс. лет.

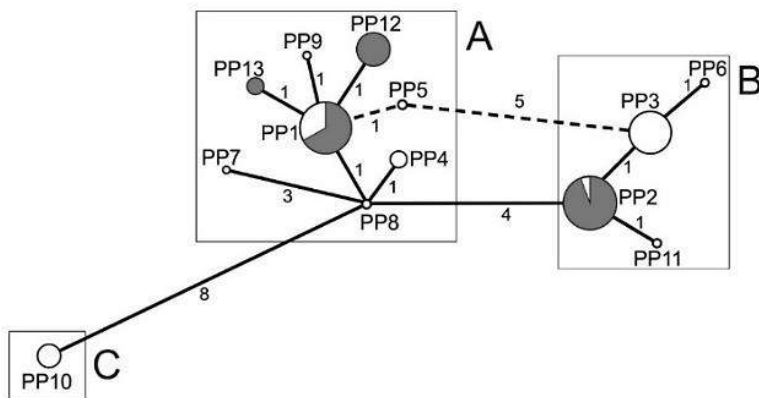
Максимальное значение нескорректированных  $p$ -расстояний 0,0067 (0,67%) было обнаружено между нуклеотидными последовательностями географически удаленных особей р. Найба и р. Нарва. Среднее генетическое расстояние между кладами А и В байесовской филограммы составило 0,004 (0,4%). В то же время, показатели генетической изменчивости внутри выбранных клад оказались минимальны (0,1%). Анализ байесовских контурных диаграмм с средним и медианным значением  $N_eT$  демонстрирует наличие общего тренда развития (Рисунок

3). На графиках присутствует период относительно постоянной численности популяций кеты на протяжении всей эволюционной истории: с момента дивергенции основных филогрупп (220 тыс. лет назад) до отметки 75 тыс. лет. Следующий период постепенного роста, продолжающийся в настоящее время, очевиден на графике медианных значений демографического показателя  $N_eT$  (Рисунок 3 А), в то время как при использовании средних показателей увеличение численности имеет более линейный характер (Рисунок 3 Б).



**Рисунок 3** – Байесовские контурные диаграммы, построенные для комбинированных последовательностей мтДНК кеты *Oncorhynchus keta*. График показывает изменение показателя  $N_eT$  (произведение эффективной численности популяций и продолжительности одного поколения) с течением времени. Сплошная линия – медиана (А) и среднее (Б) показателя  $N_eT$ , затемненный участок – 95% интервал наивысшей апостериорной плотности распределения оценок.

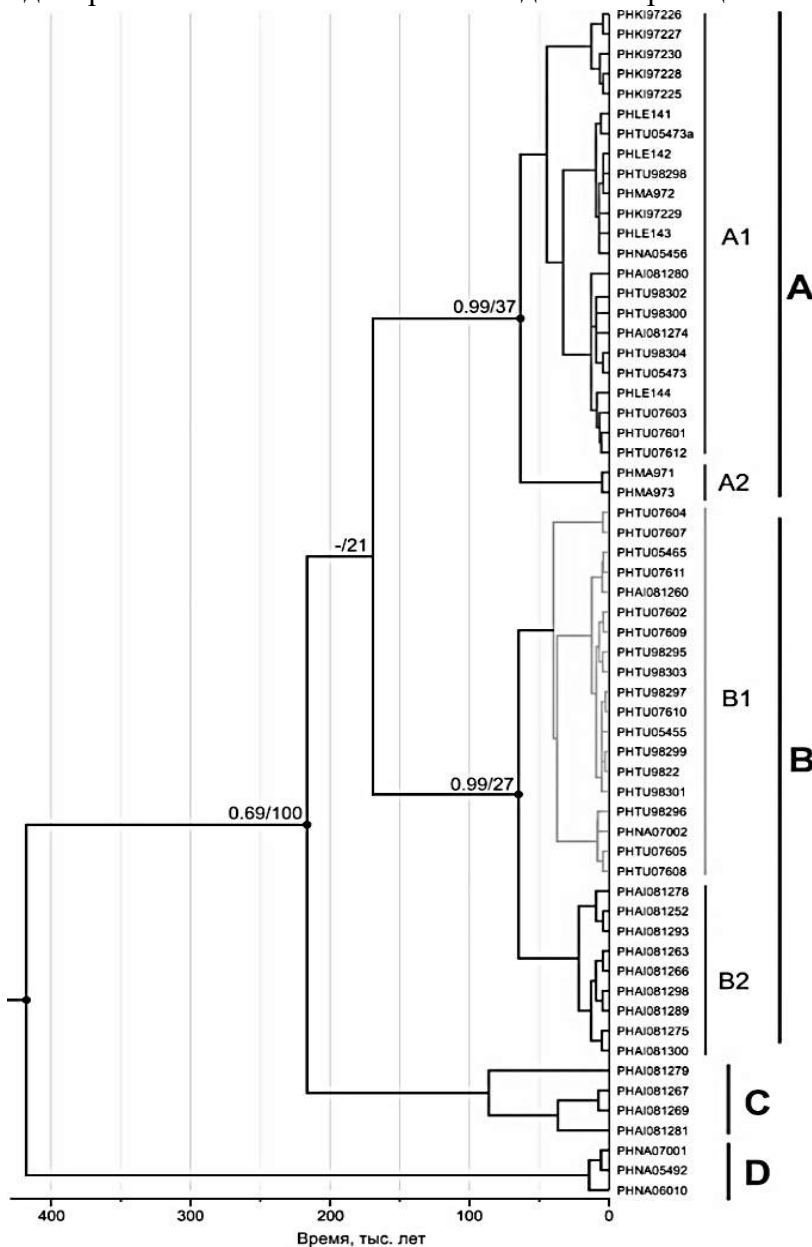
**3.2. Сахалинский таймень *Parahucho perryi*.** Анализ нуклеотидной изменчивости выявил у исследованных особей сахалинского тайменя из разных выборок 13 гаплотипов мтДНК. Во всех выборках, за исключением выборки из Набильского залива, имеется общий гаплотип PP1. Еще один общий гаплотип, PP2, встречается в материковой популяции р. Тумнин и оз. Айнское (западное побережье острова Сахалин). Все остальные гаплотипы уникальны для той или иной выборки. Популяция оз. Айнское обладает наибольшим количеством гаплотипов (8), среди них шесть – уникальные. Значение гаплотипического (но не нуклеотидного) разнообразия этой популяции также самое высокое ( $0,758 \pm 0,110$  и  $0,00211$ , соответственно). Выборка из Набильского залива содержит 3 уникальных гаплотипа (PP9, PP10 и PP11) и характеризуется высокими значениями гаплотипического ( $0,700 \pm 0,218$ ) и наибольшим значением нуклеотидного ( $0,00447$ ) разнообразия. В выборке из р. Тумнин 17 особей образуют общую (PP2) филогруппу с выборкой из оз. Айнское. Следует отметить, что в материковых выборках тайменя из рек Киевка и Максимовка выделяется по одному уникальному гаплотипу (гаплогруппы PP12 и PP13, соответственно). Согласно анализу сети гаплотипов мтДНК особи сахалинского тайменя образуют 3 дивергировавшие филогруппы (Рисунок 4). В филогруппе А центральное положение



**Рисунок 4** – Генеалогическая сеть гаплотипов, полученная на основании данных анализа нуклеотидных последовательностей генов *COI* и *cytb* мтДНК *Parahucho perryi*. Размеры окружностей пропорциональны числу особей с указанным гаплотипом. Доля особей кеты с материкового побережья Японского моря отмечена серым цветом. На ветвях сети указано количество нуклеотидных замен между группами гаплотипов.

занимает гаплотип PP1, в филогруппе В – гаплотип PP2, который отличается 5 нуклеотидными заменами. Оба с высокой частотой встречаются в материковых популяциях, но также отмечены и в островных. Филогруппа С представлена единственным гаплотипом PP10 из Набильского залива и отличается от ближайшего гаплотипа 8 нуклеотидными заменами.

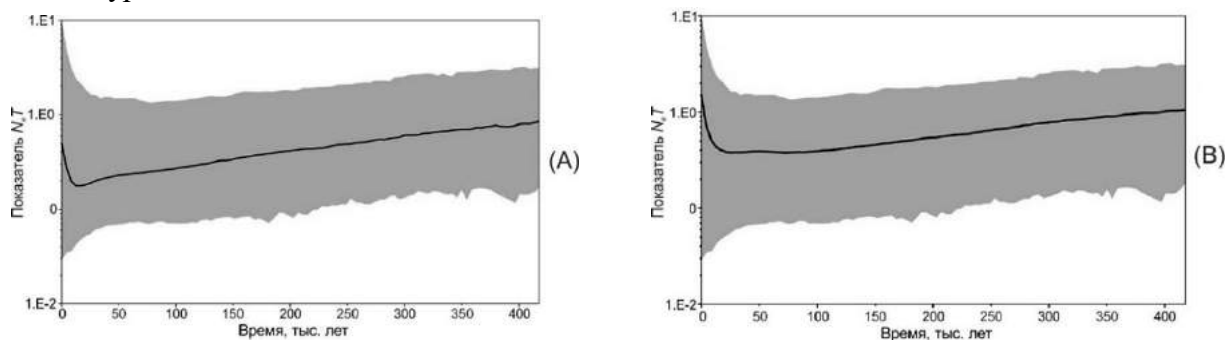
Согласно топологии филограммы, полученных с использованием алгоритмов VI и NJ, все особи сахалинского тайменя были разделены на четыре основные группы (Рисунок 5). Базальное положение по отношению ко всем группам занимают три особи сахалинского тайменя из Набильского залива, составляющих кладу D. Среднее значение оценки времени дивергенции этой филогруппы от остальных составило порядка 430 тыс. лет (95% интервал наивысшей апостериорной плотности 55 тыс. – 1 млн лет). Образование клад А и В было статистически слабо поддержано, в то время как субклады А1–А2 и В1–В2 на байесовской филограмме имели достоверные значения апостериорных вероятностей. Смешанная клад А1 содержит особи сахалинского тайменя, встречающихся в материковых и островных выборках. Клада А2 образована только двумя особями из р. Максимовка. Клада В1 включают преимущественно особей материковых популяций (р. Тумнин), в то время как группа В2, напротив, состоит только из особей островных выборок (оз. Айнское). Формирование описанных субклад происходило одновременно около 80 тыс. лет назад. Кластеризация четырех особей из оз. Айнское (клада С)



полностью разрешена с высокими значениями поддержки только в случае NJ филограммы и датируется 220 тыс. лет.

Наибольшее значение генетической дивергенции 0,0089 (0,89%) отмечено между особями выборок из о. Сахалин (оз. Айнское и Набильский залив). Основная клада D характеризуется высокими значениям  $p$ -расстояний при попарном сравнении с другими кладами байесовской филограммы, в некоторых случаях превышая значения в 1,5–2 раза. Минимальные значения генетических расстояний, полученные для субклад A1–A2 и B1–B2, не превышали 0,0008 (0,08%) и 0,0007 (0,07%), соответственно. Только внутри клады C обнаружена высокая генетическая изменчивость (0,14%).

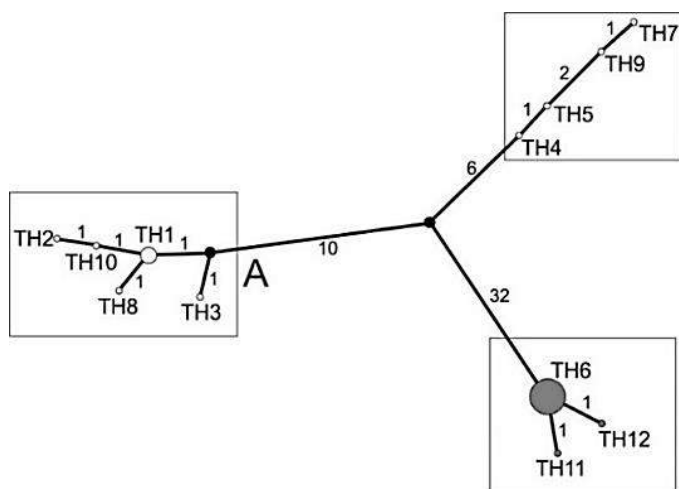
Байесовские контурные диаграммы с средним и медианным значением  $N_eT$  отражают устойчивое сокращение эффективной численности популяций сахалинского тайменя от момента дивергенции генеалогических линий (430 тыс. лет назад) до периода времени 12–15 тыс. лет назад (Рисунок 6 А, Б). График с использованием медианных значений характеризуется более резким сокращением численности популяций, заметно ускорившемся около 50 тыс. лет назад (Рисунок 6 А). На графике средних значений снижение эффективного размера популяций происходит более плавно, с образованием периода стабильной численности 20–90 тыс. лет (Рисунок 6 Б). После этого периода численность начинает резко возрастать, но не достигает исходного уровня.



**Рисунок 6** – Байесовские контурные диаграммы, построенные для комбинированных последовательностей мтДНК сахалинского тайменя *Parahucho perryi*. График показывает изменение показателя  $N_eT$  (произведение эффективной численности популяций и продолжительности одного поколения) с течением времени. Сплошная линия – медиана (А) и среднее (Б) показателя  $N_eT$ , затемненный участок – 95% интервал наивысшей апостериорной плотности распределения оценок.

**3.3. Крупночешуйная красноперка *Tribolodon hakonensis*.** Анализ нуклеотидных последовательностей у исследованных особей показал наличие 12 гаплотипов мтДНК. Популяция крупночешуйной красноперки из р. Ильинка отличается наибольшим количеством гаплотипов (9). В материковой выборке (зал. Восток) насчитывается всего три гаплотипа. Гаплотипы, обнаруженные в выборках р. Ильинка и зал. Восток не перекрываются друг с другом и встречаются только в пределах исследуемых популяций. В материковой популяции (зал. Восток) выделяется наиболее встречаемый гаплотип ТН6, объединяющий 7 особей выборки. Гаплотипы сахалинской популяции р. Ильинка (ТН1–ТН5, ТН7–ТН10) в равной степени встречаются среди исследуемых особей. Распределение гаплотипов подтверждается значениями гаплотипического и нуклеотидного распределения. Наиболее высокие значения гаплотипической ( $0,978 \pm 0,054$ ) и нуклеотидной ( $0,00704$ ) изменчивости выявлены в выборке из р. Ильинка острова Сахалин. Меньшие значения характерны материковой выборке из залива Восток,  $0,417 \pm 0,191$  и  $0,00027$ , соответственно. При реконструкции филогенетических отношений на основании анализа сети гаплотипов выделены три группы особей *Tribolodon hakonensis* (А, В и С) (Рисунок 7). Филогруппы А и С содержат по одному центральному гаплотипу (ТН1 и ТН6).

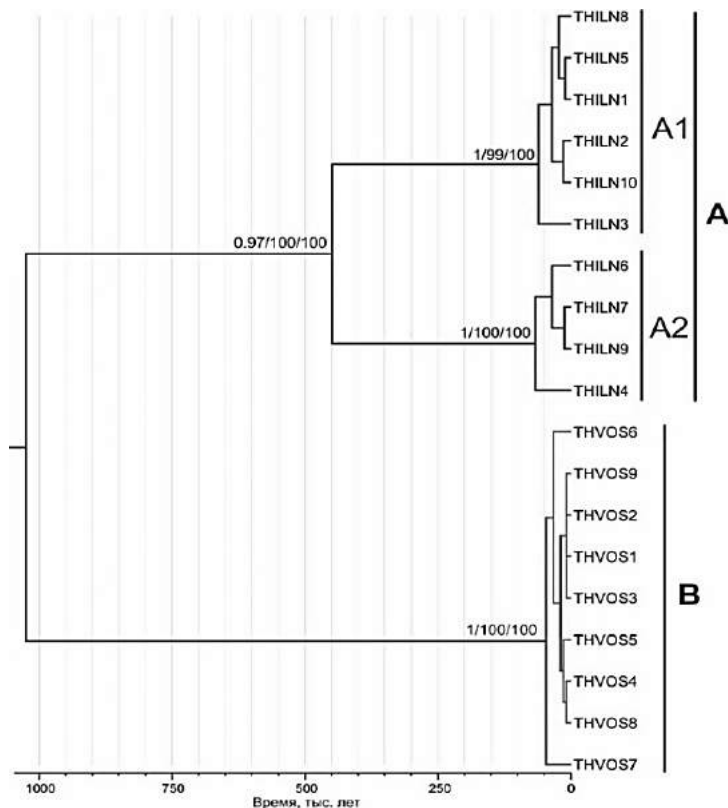
Остальные гаплотипы отличаются от них 1–2 нуклеотидными заменами. Филогруппа В объединяет гаплотипы TH4, TH5, TH9 и TH7, различающиеся по 1–2 нуклеотидным заменам. Все гаплотипы из филогруппы С характерны для особей крупночешуйной красноперки из зал. Восток (материковое побережье), в то время как филогруппы А и В встречаются у особей в популяции



**В** Рисунок 7 – Генеалогическая сеть гаплотипов, полученная на основании данных анализа нуклеотидных последовательностей генов *COI* и *cytb* мтДНК крупночешуйной красноперки. Размеры окружностей пропорциональны числу особей с указанным гаплотипом. Доля особей красноперок с материкового побережья Японского моря отмечена серым цветом. Темные окружности соответствуют отсутствующим промежуточным гаплотипам. На ветвях сети указано количество нуклеотидных замен между группами гаплотипов.

из р. Ильинка (о. Сахалин). Гаплотипы группы А отделяется 16 нуклеотидными заменами от ближайшего гаплотипа из филогруппы В. Материковая филогруппа С в значительной степени удалена от групп А и В на 42 и 38 нуклеотидные замены, соответственно.

В результате использования различных алгоритмов филогенетического анализа (BI, ML и NJ) получены деревья с единой топологией (Рисунок 8). Анализ показал наличие трех выраженных кластеров особей *Tribolodon hakonensis* с достоверными значениями бутстреп-поддержки и апостериорных вероятностей. В составной кластер А вошли все исследованные

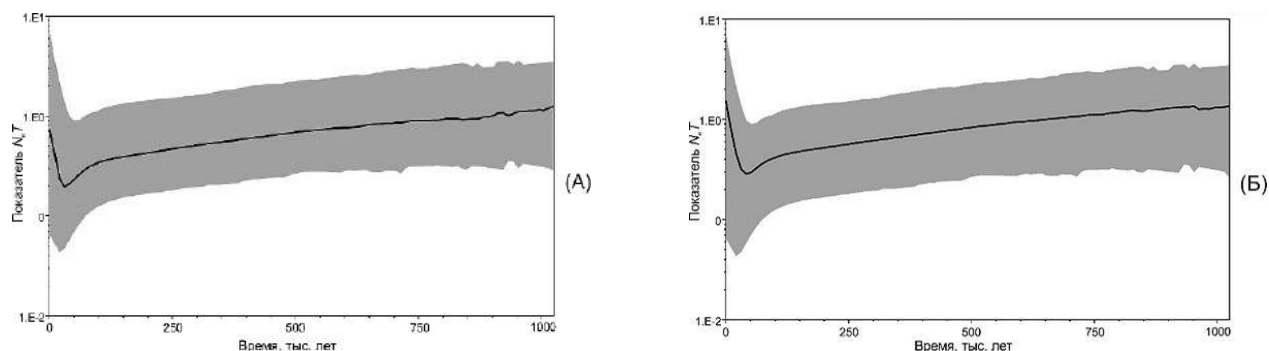


**Рисунок 8** – Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, отражающее генетическую изменчивость популяций и время дивергенции основных генеалогических линий крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis* (в тыс. лет) по данным комбинированных последовательностей двух фрагментов мтДНК (*COI* и *cytb*). Достоверность ветвления основных узлов указана в виде величин апостериорных вероятностей (BI), бутстреп-индексов (% от 1000 реплик) объединения соседей (NJ) и максимального правдоподобия (ML) (PP/BP/VP).

особи с острова Сахалин (р. Ильинка), в то время как кластер В объединил особей материкового побережья (зал. Восток). Клада А включает субклады А1 и А2 с высокими показателями достоверности по всем использованным алгоритмам. Среднее время дивергенции двух групп крупночешуйной красноперки (А и В), представленное на байесовской хронограмме, составило около 1 млн лет назад с 95% интервалом наивысшей апостериорной плотности от 459 тыс. лет до 1,8 млн лет. Датировка различий субклад А1–А2 составила около 450 тыс. лет.

Наибольшее значение нескорректированных  $p$ -расстояний между нуклеотидными последовательностями географически удаленных особей зал. Восток и р. Ильинка составило 0,0271 (2,71%). Среднее генетическое расстояние между кладами А1 и А2 байесовской филограммы зафиксировано на уровне 0,0121 (1,21%). В тоже время показатели генетической изменчивости внутри выделенных клад оказались минимальны и варьировали в пределах 0,0003–0,0012 (0,03–0,12%).

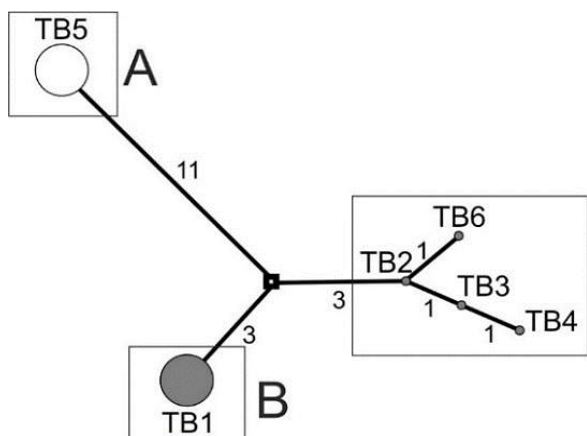
Байесовские контурные диаграммы А и Б на рисунке 9 демонстрируют общий тренд сокращения численности популяций крупночешуйной красноперки с момента дивергенции популяций материкового побережья Японского моря и о. Сахалин предположительно около 1 млн лет. Интенсивность снижения значений  $N_eT$  заметно усиливается от отметки приблизительно 110–125 тыс. лет, достигая своих минимальных значений 20–45 тыс. лет. При этом реконструкция с выбором медианных значений характеризуется более резким сокращением эффективного размера популяций (Рисунок 9 А). Два вида графиков реконструкций показывают быстрый рост значений  $N_eT$  за последние 20 тыс. лет.



**Рисунок 9** – Байесовские контурные диаграммы, построенные для комбинированных последовательностей мтДНК крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis*. График показывает изменение показателя  $N_eT$  (произведение эффективной численности популяций и продолжительности одного поколения) с течением времени. Сплошная линия – медиана (А) и среднее (Б) показателя  $N_eT$ , затемненный участок – 95% интервал наивысшей апостериорной плотности распределения оценок.

**3.4. Мелкочешуйная красноперка *Tribolodon brandtii*.** Анализ нуклеотидных последовательностей у исследованных особей мелкочешуйной красноперки показал наличие 6 гаплотипов. Популяция мелкочешуйной красноперки материкового побережья из зал. Восток включает наибольшее количество гаплотипов (5), характерных только для данной популяции. При этом гаплотип ТВ1 является наиболее часто встречаемым, в то время как уникальные гаплотипы ТВ2, ТВ3 ТВ4 и ТВ6 представлены единичными особями. Все исследованные особи популяции оз. Тунайча образуют единый гаплотип ТВ5. Общих гаплотипов среди исследованных особей материкового побережья и о. Сахалин не обнаружено. Высокие значения гаплотипической ( $0,576 \pm 0,163$ ) и нуклеотидной (0,00227) изменчивости характерны для популяции из зал. Восток. В сахалинской выборке из оз. Тунайча генетическая изменчивость не обнаружена. Полученные данные сети гаплотипов свидетельствуют о присутствии среди особей мелкочешуйной красноперки трех филогрупп (А, В и С) (Рисунок 10).

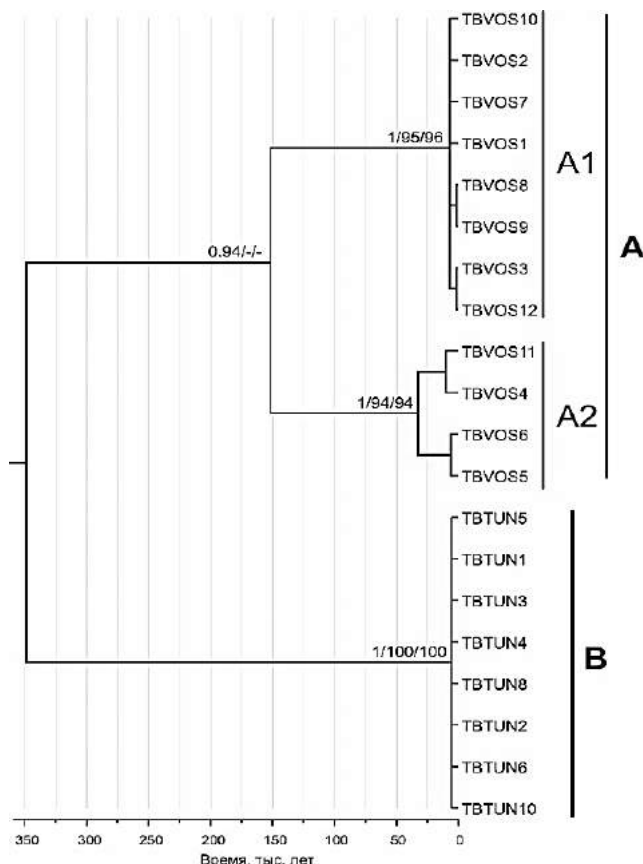
Особи материкового побережья из зал. Восток формируют группы В и С с центральными гаплотипами ТВ1 и ТВ2, соответственно. Данные группы отличаются в среднем шестью



**Рисунок 10** – Генеалогическая сеть гаплотипов, полученная на основании данных анализа нуклеотидных последовательностей генов *COI* и *cytb* мтДНК мелкочешуйной красноперки. Размеры окружностей пропорциональны числу особей с указанным гаплотипом. Доля особей красноперок с материкового побережья Японского моря отмечена серым цветом. На ветвях сети указано количество нуклеотидных замен между группами гаплотипов.

нуклеотидными заменами. Гаплотипы в филогруппе С отличаются 1–2 нуклеотидными заменами. Группа А содержит всех представленных особей мелкочешуйной красноперки с о. Сахалин и отделяется от материковых групп 14 нуклеотидными заменами.

Топология филогенетических деревьев, реконструированных по комбинированным последовательностям мтДНК мелкочешуйной красноперки была идентичной при использовании различных алгоритмов построения (BI, ML и NJ) (Рисунок 11). Анализ подтверждает наличие трех обособленных кластеров особей *Tribolodon brandtii*. Клада В включает особей красноперок из оз. Тунайча (о. Сахалин). Материковая кллада А образует субклады А1 и А2, формирование которых поддержано относительно слабо. Только в случае байесовской филограммы значение апостериорных вероятностей оказалось близким к достоверным (0,94). Байесовская хронограмма с установленными средними значениями времени различий показывает, что выделенные группы



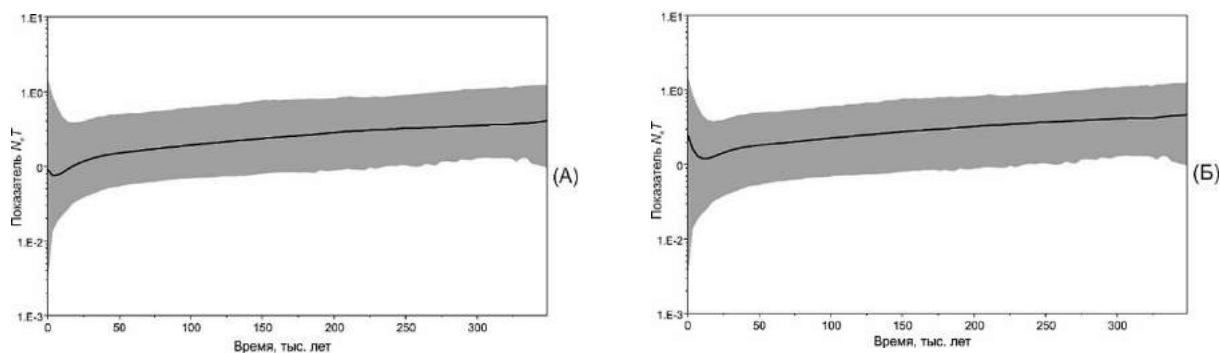
**Рисунок 11** – Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, отражающее генетическую изменчивость популяций и время дивергенции основных генеалогических линий мелкочешуйной красноперки *Tribolodon brandtii* (в тыс. лет) по данным комбинированных последовательностей двух фрагментов мтДНК (*COI* и *cytb*). Достоверность ветвления основных узлов указана в виде величин апостериорных вероятностей (BI), бутстреп-индексов (% от 1000 реплик) объединения соседей (NJ) и максимального правдоподобия (ML) (PP/BP/VP).



мелкочешуйной красноперки (А и В) дивергировали приблизительно около 350 тыс. лет назад с 95% интервалом наивысшей апостериорной плотности от 139 до 669 тыс. лет. Время дивергенции внутри кластера А составило около 150 тыс. лет.

Наибольшее значение генетических расстояний между нуклеотидными последовательностями географически удаленных особей зал. Восток (клада А) и оз. Тунайча (клада В) составило 0,0102 (1,02%). Среднее значение нескорректированных  $p$ -расстояний между кладами А1–А2 байесовской филограммы зафиксировано на уровне 0,0045 (0,45%). Показатели генетической изменчивости внутри выделенных клад оказались минимальны и изменялись в пределах 0–0,00106 (0–0,106%).

Байесовские контурные диаграммы с средним и медианным значением  $N_eT$  (Рисунок 12) отражают постепенное сокращение эффективной численности популяций мелкочешуйной красноперки с момента дивергенции материковых и островных генеалогических линий около 350 тыс. лет до периода времени 10–12 тыс. лет. Скорость снижения параметра  $N_eT$  усиливается в период около 50 тыс. лет назад, что особо заметно на графике медианных значений (Рисунок 12 А). После периода снижения наблюдается рост эффективной численности популяций в период последних 10 тыс. лет.



**Рисунок 12** – Байесовские контурные диаграммы, построенные для комбинированных последовательностей мтДНК мелкочешуйной красноперки *Tribolodon brandtii*. График показывает изменение показателя  $N_eT$  (произведение эффективной численности популяций и продолжительности одного поколения) с течением времени. Сплошная линия – медиана (А) и среднее (Б) показателя  $N_eT$ , затемненный участок – 95% интервал наивысшей апостериорной плотности распределения оценок.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

**4.1. Закономерности пространственного распределения генетической изменчивости исследуемых видов.** В настоящей работе исследована изменчивость мтДНК у четырех видов рыб северо-западной Пацифики, относящихся к семействам Salmonidae и Cyprinidae. Они имеют разные истории происхождения, биологические особенности, ареалы и численность. Выборки сахалинского тайменя и дальневосточных красноперок были взяты на значительной части географического ареала этих видов. Для кеты исследованный регион представляет лишь небольшую часть исходного ареала. Тем не менее, для всех видов выявлены сходные закономерности.

Уровень генетической изменчивости определяется несколькими параметрами: временем существования вида, ареалом и численностью (Avice, 2000). Несмотря на то, что исследованные нами виды отличаются по этим параметрам, общие значения гаплотипической изменчивости популяций видов находятся на достаточно высоком уровне. Относительно высокий уровень гаплотипической изменчивости у сахалинского тайменя ( $0,8215 \pm 0,03$ ) может определяться более длительным временем существования вида. Кета как вид существует много меньше времени, но высокая численность и внутривидовая дифференциация, как следствие эффекта «хominga»,

определяет ее высокий уровень генетической изменчивости ( $0,9011 \pm 0,034$ ). Савин с соавторами (2009) выделяет данную особенность жизненного цикла лососевых рыб как одну из главных причин значительной изоляции и генетической неоднородности локальных групп популяций. Значения нуклеотидной изменчивости у сахалинского тайменя и кеты одинаковы ( $0,00259$  и  $0,00266$ , соответственно).

Виды дальневосточных красноперок характеризуются близкими показателями изменчивости мтДНК. Для крупночешуйной красноперки характерно более длительное существование как вида (Sasaki et al., 2007), с чем связаны более высокие оценки гаплотипической и нуклеотидной изменчивости ( $0,871 \pm 0,00525$  и  $0,01528$ , соответственно), по сравнению с мелкочешуйной красноперкой ( $0,705 \pm 0,00488$  и  $0,00542$ ). Исследование особенностей биологии данных видов на юге Приморского края, а также результаты мечения позволяют предположить, что дальневосточным красноперкам также свойственны определенные места нагула, то есть обладают, по-видимому, способностью различать водоемы и возвращаться после нагула в одни и те же реки, где осуществляют нерест и зимовку (Большаков, 2013).

Уровень нуклеотидного разнообразия сахалинских популяций *Parahucho perryi* на порядок превышает нуклеотидное разнообразие популяций материкового побережья. При этом в популяции Набильского залива не найдено ни одного гаплотипа общего с другими популяциями, в том числе и из оз. Айнское, которое характеризуется наивысшим гаплотипическим разнообразием на о. Сахалин. Аналогичные результаты были получены при анализе микросателлитных локусов сахалинского тайменя (Шитова и др., 2012). Кроме того, в работе Животовского с соавторами (2015) показано разделение популяций сахалинского тайменя на генетические отдаленные эко-географические единицы (EGUs) о. Сахалин и материкового побережья Японского моря.

Сходная закономерность выявлена также в исследованных популяциях крупночешуйной красноперки. Уровень гаплотипической изменчивости сахалинской выборки вида в два раза превышает значения для популяции материкового побережья. ПДРФ-анализ множества выборок крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis* так же показал значительные различия при сравнении географически удаленных популяций, связанных с изоляцией расстоянием и, следовательно, ограничением потока генов (Брыков и др., 2013).

Другой характер распределения показателей разнообразия был обнаружен в популяциях кеты и мелкочешуйной красноперки. В отличие от двух других видов региона, высокий уровень гаплотипического и нуклеотидного разнообразия был зафиксирован в материковых популяциях, тем самым подтверждая предположение о древности и, во многих отношениях, уникальности популяций Японского моря. Распределение генетического разнообразия в выборках мелкочешуйной красноперки совпадает с полученными ранее данными анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов мтДНК. В работе Брыкова с соавторами (2013) значительная часть изменчивости приходилась на различия между сахалинской выборкой (зал. Анива) и материковыми популяциями.

Как следует из наших данных, у кеты филогруппы в значительной степени разделены в пространстве. Все гаплотипы (ОК1–2, ОК6, ОК8, ОК9–14) группы В обнаруживаются в материковых популяциях Японского моря, большая часть гаплотипов (ОК4–5, ОК7) группы А – в выборке Охотского моря (Рисунок 1). Этот факт подтверждает, что формирование филогрупп определялось существованием в прошлой истории вида изолированных популяций, а генетический обмен между ними отсутствует или незначителен на протяжении многих поколений. Исследования изменчивости мтДНК кеты, включающее большую часть ареала, выявило статистически значимо выраженные группы популяций: побережье Японского моря (1),

побережье Охотского моря и западная зона Берингова моря (2), северо-запад Аляски (3) и зал. Аляска (4) (Yoon et al., 2008; Полякова и др., 2006).

Присутствие одного общего гаплотипа (PP1) в 5 из 6 выборок сахалинского тайменя позволяет предположить о существование единого источника при освоении видом данного региона. Полученные топологии филогенетических деревьев (Рисунок 5) и структура генеалогий гаплотипов (Рисунок 4) указывают на то, что все популяции сахалинского тайменя произошли от одного общего предка, обитавшего, вероятнее всего, на западном побережье Сахалина. При этом более древняя форма сахалинского тайменя представлена, как минимум, двумя различными эволюционными линиями, относящимися к водоемам восточного и западного побережья о. Сахалин. Эти данные также согласуются с результатами ПДРФ-анализа участков генов *cytb*, контрольного региона (D-loop), 1-4 субъединиц надоксиддегидрогеназы (ND1/ND2, ND3/ND4L/ND4) (Скурихина и др., 2013). В соответствии с литературными данными, популяции *Parahucho perryi* различаются также и по морфобиологическим характеристикам (Ключарева, 1967; Золотухин, Семенченко, 2008).

Для кеты направление распределения генетической изменчивости оказалось противоположным. Популяции материкового побережья являются наиболее изменчивыми (р. Нарва) и, следовательно, сформировались ранее, чем островные. Принимая во внимание работу Юна с соавторами, можно предположить, что центр происхождения кеты располагается в акватории Японского моря и приурочен к материковому побережью. Выявленные авторами частоты гаплотипов контрольного региона мтДНК отражают направление распространения кеты по всему побережью северо-западной Пацифики (Yoon et al., 2008).

Высокая изменчивость особей материковой выборки и топология филогенетических реконструкций мелкочешуйной красноперки подтверждает существование предкового рефугиума на территории материкового побережья Японского моря. Наличие материковых филогрупп гаплотипов В и С (Рисунок 10) указывает на присутствие как минимум двух предковых линий мелкочешуйной красноперки. Ранее наличие сходной популяционно-генетической структуры вида было установлено с помощью методов ПДРФ-анализа мтДНК и изменчивости аллозимов (Брыков и др., 2013; Sakai et al., 2002).

Более сложная картина наблюдается у крупночешуйной красноперки *Tribolodon hakonensis*. Высокие значения генетических *p*-дистанций (клада В–А1/А2 – 2,5–2,6%), а также значительная удаленность материковой филогруппы С в сети гаплотипов (Рисунок 7) обусловлены присутствием «южной формы» крупночешуйной красноперки, выделяемой многими авторами в отдельный близкий вид *Tribolodon* sp. (Семина и др., 2006; Гудков и др., 2010; Рязанова, Полякова, 2012). При этом мтДНК у первоописанного вида *Tribolodon hakonensis*, или «северная форма», в популяциях о. Сахалин образует две, относительно сильно дивергировавшие, эволюционные линии (группы А и В). Относительная молодость вида выражается низким уровнем гетерогенности мтДНК (зал. Восток), что так же соответствует данным по расширенным выборкам в предыдущих работах (Семина и др., 2007; Брыков и др., 2013).

В распределении нуклеотидных различий между всеми гаплотипами у исследуемых видов семейства Salmonidae выделяется по крайней мере две вершины, что свойственно для конспецифичных представителей пространственно изолированных популяций (Avice, 2000). Звездообразные структуры гаплотипов вокруг центральных, наиболее часто встречающихся гаплотипов каждой из филогрупп, свидетельствует о сравнительно недавнем резком увеличении численности популяций вида и их распространении из одной географической локации. Наличие альтернативной связи (Рисунок 4) между гаплотипами сахалинского тайменя может быть

результатом гомоплазии, а именно повторных и обратных мутаций в мтДНК (Churikov et al., 2001).

Для графиков распределения нуклеотидных замен между гаплотипами дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* характерно наличие трех вершин. Отличия заключается только в степени наблюдаемых различий. Общность распределения между гаплотипами из выборок с материкового побережья и о. Сахалин у исследованных видов свидетельствует о сходстве факторов, определявших формирование филогрупп. Обнаруженная закономерность образования двух и более различных групп гаплотипов показана на примере многих пресноводных и морских видов рыб северо-западной Пацифики, подчеркивая уникальность данного региона (Шедько и др., 2015; Yu et al., 2010; Горбачев и др., 2014).

**4.2. Датировка этапов дивергенции внутривидовых единиц.** При анализе байесовских хронограмм особей популяций у сахалинского тайменя выявляется четыре этапа дивергентной эволюции (Рисунок 5), у кеты – три (Рисунок 2). Первый период дивергенции у тайменя приходится на время 430 тыс. лет назад, второй – 220 тыс. лет, третий – 70 тыс. лет назад. Период в 170 тыс. лет, отмеченный на филограмме, имеет низкое значение апостериорной вероятности и бутстреп-поддержки и не рассматривается как отдельный этап дивергентной эволюции. У кеты первый этап соответствует 220 тыс. лет назад, второй – в районе 100 тыс. лет. Основная доля выявляемых гаплотипов у обоих видов формировалась 50–10 тыс. лет назад (четвертый и третий этапы дивергенции, соответственно) (Таблица 1).

Таблица 1 – Датировка этапов дивергенции внутривидовых единиц исследуемых таксонов

Название вида	Плейстоцен					Голоцен
	Эоплейстоцен	Неоплейстоцен				
		Миндель (478–424 тыс. лет)	Рисс (347–130 тыс. лет)	Вюрм (110–12 тыс. лет)		
<i>Parahucho perryi</i>	–	1 этап (430 тыс. лет)	2 этап (220 тыс. лет)	3 этап (70 тыс. лет)	4 этап (50–10 тыс. лет)	
<i>Tribolodon hakonensis</i>	1 этап (1 млн лет)	2 этап (450 тыс. лет)	–	–	3 этап (70–10 тыс. лет)	
<i>Oncorhynchus keta</i>	–	–	1 этап (220 тыс. лет)	2 этап (100 тыс. лет)	3 этап (50–10 тыс. лет)	
<i>Tribolodon brandtii</i>	–	1 этап (350 тыс. лет), 2 этап (150 тыс. лет)		–	3 этап (35–10 тыс. лет)	

Байесовские хронограммы исследованных видов рода *Tribolodon* позволяют выделить три этапа дивергенции (Рисунок 8 и 11). Начальный этап формирования эволюционных линий крупночешуйной красноперки связан с дивергенцией «северной» (о. Сахалин) и «южной» формы (материковое побережье, Приморье) около 1 млн лет назад. Второй этап датирован 450 тыс. лет назад, третий – около 70–10 тыс. лет. У мелкочешуйной красноперки первый этап соответствует 350 тыс. лет, второй – 150 тыс. лет назад и третий – около 35–10 тыс. лет.

Исследования, включающие датировку внутривидовой изменчивости дальневосточных красноперок, единичны. По данным ПДРФ-анализа мтДНК временные границы возникновения внутривидовой изменчивости у дальневосточных красноперок варьировали в пределах 1,3–1,8 млн лет назад, в соответствии со скоростью эволюции на уровне 1,6% за 1 млн лет (Брыков и др., 2013). Данные значения частично соответствуют верхнему пределу оценок дивергенции

«южной» и «северной» формы крупночешуйной красноперки, в то время как образование филогрупп внутри регионов по результатам настоящей работы происходило относительно недавно.

Полученные оценки времени дивергенции внутривидовых единиц у исследуемых таксонов соответствуют плейстоценовой эпохе. Осцилляции палеоклимата в плейстоцене происходили приблизительно каждые 100 тыс. лет и имели первостепенное значение в истории северной Пацифики (Miller et al., 2011). Похолодание и наступление ледников, снижение уровня океана и частичная или полная изоляция от океана с опреснением внутренних морей, Японского и Охотского, могли быть основными факторами, определяющими дивергенцию пресноводных и морских рыб (Брыков, Подлесных, 2001; Gharrett et al., 2001; Баланов и др., 2004; Скурихина и др., 2013).

Наиболее поздние оценки времени дивергенции среди исследуемых нами видов соответствуют первому этапу дивергенции крупночешуйной красноперки, датированным нижним плейстоценом (верхним эоплейстоценом). Холодный климат данного периода, связанный с глобальным дунайским оледенением, способствовал резкому снижению уровня моря. По данным Василевского (2008), с ссылкой на данные японских исследователей, Сахалин в это время входил в состав палеосуши, простиравшейся от Юго-Восточной Азии до Камчатки.

Первый этап формирования отдельных филогрупп у сахалинского тайменя и второй этап у крупночешуйной красноперки приходится на миндельский (окский) ледниковый период (478–424 тыс. лет назад). Горно-долинные оледенения средней и южной части острова, характерные для данного периода (Василевский, 2008) с большой долей вероятности послужили причиной изоляции популяции сахалинского тайменя восточного (Набильский залив) и западного (оз. Айнское) побережья. Уровень Японского моря у берегов о. Сахалин в результате регрессии минделя понизился до отметок около 100 м ниже современного, а трансгрессия межледниковой эпохи миндель–рисса подняла его почти до современных отметок (Korotky et al., 1997). Первый этап дивергенции сахалинских и материковых популяций мелкочешуйной красноперки приурочен к окончанию межледниковой эпохи на границе миндель–рисса.

Еще один период дивергенции мтДНК у сахалинского тайменя, кеты и мелкочешуйной красноперки приходится на рисский (днепровский) ледниковый период (347–130 тыс. лет назад). В результате мощных регрессий, сформировавших берег Японского моря на отметке около 140–150 м ниже современного, возникла сухопутная связь Сахалина с Северным Приморьем, с о. Хоккайдо и Южными Курильскими островами (Кулаков, 1973; Свиточ, 2003). Василевский отмечает что на протяжении плейстоцена острова Сахалин и Хоккайдо были практически постоянно связаны с материком, исключая периоды максимального потепления климата и соответствующих по величине трансгрессий. По Короткому, нарушение связи Сахалина с материком происходили 400–360 тыс. лет назад и несколько раз в интервалах 130–80 тыс. лет назад (Korotky et al., 1997). Таким образом, заселение о. Сахалин популяциями кеты и миграция сахалинского тайменя в водоемы материка могли происходить через р. Амур, образовавшую единую и целостную речную систему с палеополуостровом. В отдельные периоды русла палео-Амура проходили по территории Северного Сахалина, смыкаясь с бассейном р. Тымь. Вполне вероятно, что полуостров входил в маршруты ежегодных миграций и постоянные ареалы среднеледниковой фауны континента (Василевский, 2008). Дальнейшее разделение и продолжительная изоляция островных и материковых популяций видов вероятно произошли в период потепления на границе рисс–вюрма, восстановившего уровень океана до современных показателей.

На протяжении следующего периода, датируемым вюрмским (валдайским) оледенением (110–12 тыс. лет назад), изоляция популяций кеты и сахалинского тайменя неоднократно усиливалась под воздействием регрессий. Наиболее существенные из них произошли около 50 и 25 тыс. лет назад (Korotky et al., 1997). Также стоит отметить синхронность влияния климатических процессов на фауну и флору территории островов и материка, о чем говорит совпадение видового состава ископаемых форм среднего и позднего плейстоцена с островов Хоккайдо, Сахалина и Приморья (Василевский, 2008).

Последний этап образования гаплотипов (70–10 тыс. лет назад), очевидно, связан с отступлением ледников и расширением ареалов у исследуемых видов в голоцене. Одним из важнейших событий рубежа плейстоцена и голоцена стало формирование пролива Лаперуза около 13–12 тыс. лет назад, а также резкое расширение проливов Цусима и Цугару. Эти процессы имели довольно большие последствия для окружающей среды, поскольку определили новый температурный режим, степень солености воды в Японском море и новые возможности миграций ихтиофауны (Василевский, 2008). Характерные морские отложения северо-восточного побережья о. Сахалин показывают, что уровень моря в голоцене приблизился к современному сравнительно рано (около 11 тыс. лет назад) (Василевский, 2008), в результате чего была окончательно прервана сухопутная связь о. Сахалин с материком. Многие авторы связывают столь раннее превышение уровня моря с усилением в тот период приливов и последующей тектонической деформацией впадин Сахалинского залива, Амурского лимана, пролива Невельского и Татарского пролива (Каплин, Селиванов, 1999; Кулаков, 1973).

На побережье Приморья в результате трансгрессий голоценового межледниковья морские воды вторгались в переуглубленные в плейстоцене речные долины и образовывали ряд изолированных бухт с исчерченной береговой линией. Таким образом, образовавшиеся бухты в среднем–позднем голоцене изолировались от Японского моря пересыпями и заполнялись специфическими группами осадков (Каплин, Селиванов, 1999). Возникающие изоляции поддерживали накопление генетической изменчивости между популяциями исследуемых видов. Детальные геологические исследования возраста и высоты трансгрессивных фаз на побережье Приморья и острова Сахалин так же позволили предположить, что в голоцене происходили по меньшей мере три–четыре флуктуации уровня моря. Уровень моря превысил современный на несколько метров около 7, 5 и 3 тыс. лет назад (Микишин, Гвоздева, 1996, Селиванов, Степанов, 1981, 1982). По всей видимости слабые колебания уровня океана голоцена не оказывали критического влияния и во время трансгрессий сохранившиеся популяции расселялись на освобождавшиеся после отступления ледника территории.

**4.3. Роль палеоклиматических изменений в демографической истории видов.** Анализ демографической истории популяций с помощью реконструкции байесовских контурных диаграмм показал, что время начального этапа роста эффективной численности видов красноперок и сахалинского тайменя варьирует в пределах 10–20 тыс. лет (Рисунок 6, 9, 12) и совпадает по времени с окончанием последнего ледникового максимума (19–26,5 тыс. лет назад) (Clark et al., 2009) в составе вюрмского оледенения. Постепенное восстановление климатических оптимумов способствовало расселению и увеличению численности видов в пределах современных границ ареала.

Устойчивое сокращение эффективной численности популяций тайменя до отметки 12–15 тыс. лет назад может быть обусловлено множеством факторов. По всей видимости, высокая зависимость от конфигурации бассейнов рек, узкий диапазон устойчивости к температуре (Fukushima et al., 2011), наиболее сильно выраженный хоминг и минимальный стрейнг (Семенченко, Золотухин, 2011) сформировали исторический ареал вида. Сахалинский таймень

сохранил проходной образ жизни в бассейнах Японского и Охотского морей, однако его степень привязанности к эстуарию или авандельты рек в настоящее время обсуждается (Arai et al., 2004; Edo et al., 2005; Suzuki et al., 2011). Позднее наступление половой зрелости, не ежегодный нерест, характерные для сахалинского тайменя, ограничивают темп естественного воспроизводства и способствуют снижению выживаемости популяций в условиях изменяющихся условий среды.

Виды рода *Tribolodon* единственная группа карповых рыб имеющая исключительно пресноводные виды, и проходные экотипы, приспособленные к нагулу в условиях океанической солености. Комплексное влияние окружающей среды (изменений солености и температуры) могло быть главным фактором внутривидовой дивергенции таксонов. Так как большинство рек о. Сахалин имеют малую протяженность и глубину, повторяющиеся летние периоды с небольшим количеством осадков приводят к резкому снижению численности вида. Более того, в большинстве этих рек нерестятся и погибают горбуша и кета, что также приводит к ухудшению условий для существования вида (Брыков и др., 2013).

Исключение составляет период роста эффективной численности кеты, начавшийся несколько раньше, 30–35 тыс. лет назад, но ускорившийся в последние 10–15 тыс. лет (Рисунок 3). Как видно на графике, палеоклиматические изменения среды во время последнего оледенения в меньшей степени оказали влияние на демографическую историю популяций кеты, тем самым ускорив пост-ледниковую экспансию (Маляр, Брыков, 2016). По всей видимости это связано с высокой эвритермностью и широким ареалом вида. В своей работе Шунтов и Темных отмечают высокую экологическую пластичность видов тихоокеанских лососей. Лососи более эвритермны, чем это считалось ранее, особенно к низким значениям температуры воды. Поверхностная температура воды в пределах «лососевого» диапазона не является жестко лимитирующим фактором, определяющим их распространение, сроки и пути миграций (Шунтов, Темных, 2005).

В результате климатических изменений плейстоцена на поверхности Земли происходило перераспределение водных масс между океаном и ледниками, обводнение или иссушение бассейнов рек, крупные перестройки речной сети, формирование бухт и заливов (Каплин, Селиванов, 1999). Существование в таких условиях главным образом зависело от физиологических способностей видов переносить климатические колебания на протяжении холодных (ледниковых) и теплых (межледниковых) периодов. Изменение температуры очевидно влияет на интенсивность ферментативных процессов в организме рыб, изменяет активность потребления пищи, характер обмена веществ и развития половой системы, оказывая также влияние на состояния кормовой базы. На примере ряда исследований рыбопродуктивности северной Пацифики была определена роль климата как главного фактора, определяющего 50–70-летние флуктуации численности множества промысловых видов (Шунтов, 1986, 1991). Многолетняя динамика уловов наиболее крупных промысловых популяций рыб Тихого и Атлантического океанов: анчоусов, сардин, сельди, трески и тихоокеанских лососей в значительной степени коррелирует с данными о глобальных и региональных циклических колебаниях климата и атмосферной циркуляции. Современные представления о циклическом характере флуктуаций климата и биоты также позволяют усовершенствовать режим эксплуатации промысловых запасов, показывая на каком этапе долгопериодного цикла (спад или подъем численности) находится промысловая популяция (Кляшторин, Любушин, 2005).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования определены и депонированы в международную базу данных GenBank 258 новых нуклеотидных последовательностей генов *COI* и *cytb* митохондриальной ДНК кеты (*O. keta*), сахалинского тайменя (*P. perryi*), крупночешуйной (*T. hakonensis*) и

мелкочешуйной красноперки (*T. brandtii*). Сравнительный филогенетический анализ на основании полученных фрагментов позволил выявить генетическую изменчивость видов, а также особенности ее пространственного распределения. Для каждого исследуемого вида обнаружены достоверные генетические различия островных (о. Сахалин) и материковых популяций (побережье Японского моря), связанные с их продолжительной изоляцией в прошлом.

Установлены последовательность и время формирования основных эволюционных линий исследуемых таксонов. Согласно байесовской датировке полученные оценки времени дивергенции внутривидовых единиц соответствуют плейстоценовой эпохе. Мы предположили, что сходные закономерности образования филогрупп гаплотипов у данных видов возникли под воздействием колебаний среды в процессе смены ледниковых и межледниковых периодов эпохи плейстоцена, и в значительной степени синхронизированы по времени. Палеоклиматические изменения температурного режима и степени солености вод послужили основными причинами изоляции, повлиявших на внутривидовую дивергенцию у исследуемых видов рыб Японского и Охотского морей.

При исследовании демографической истории популяций видов с использованием коалесцентных подходов нами выявлен недавний период резкого увеличения численности около 10–20 тыс. лет назад, связанного с окончанием последнего ледникового максимума. Постепенное восстановление климатических оптимумов в голоцене способствовало экспансии и росту численности видов в пределах современных границ ареала. Также мы установили более ранний период роста эффективной численности у кеты (30–35 тыс. лет назад), предполагая, что степень влияния палеоклимата для каждого вида в отдельности определялась их экологическими и физиологическими особенностями.

## ВЫВОДЫ

1. При анализе изменчивости мтДНК в выборках двух видов красноперок (*T. hakonensis*, *T. brandtii*), кеты (*O. keta*) и сахалинского тайменя (*P. perryi*) выявлены особенности распределения генетической изменчивости у каждого вида на исследованном ареале, а также общие закономерности внутривидовой дивергенции.

2. Показано, что исследованные популяции *P. perryi* и *T. hakonensis* произошли из предковых рефугиумов, существовавших на о. Сахалин. При этом островная форма сахалинского тайменя представлена двумя различными эволюционными линиями, относящимися к водоемам восточного (Набильский залив) и западного (оз. Айнское) побережья. Локализация предковых рефугиумов у кеты и мелкочешуйной красноперки, наоборот, приурочена к материковому побережью Японского моря.

3. По данным молекулярной датировки внутривидовой дифференциации выявлены общие этапы дивергентной эволюции у четырех видов из семейств Salmonidae и Cyprinidae. Обособление основных генеалогических линий сахалинского тайменя и кеты началось в среднем плейстоцене около 430 и 220 тыс. лет назад, у крупночешуйной и мелкочешуйной красноперок 450 и 350 тыс. лет, соответственно.

4. Наблюдаемые генетические различия популяций видов с материкового побережья Японского моря и о. Сахалин сформировались под воздействием палеоклиматических колебаний среды в процессе смены ледниковых и межледниковых периодов в эпоху плейстоцена.

5. Исследование демографической истории популяций видов северо-западной Пацифики на основании полиморфизма генов мтДНК свидетельствует о недавнем периоде резкого увеличения численности, связанного с окончанием последнего ледникового максимума (19–26,5 тыс. лет назад).



**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ*****Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:***

1. Скурихина Л.А., Олейник А.Г., Кухлевский А.Д., **Маляр В.В.** Внутривидовой полиморфизм мтДНК сахалинского тайменя *Parahucho perryi* // Генетика. 2013. Т. 49, № 9. С. 1065–1078.
2. **Маляр В.В.**, Брыков Вл.А. Генетическая изменчивость у анадромных рыб кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum) и сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856) из северо-западной Пацифики как отражение осцилляций палеоклимата // Биология моря. 2016. Т. 42, № 4. С. 289–299.

***Работы в материалах конференций:***

3. **Маляр В.В.** Внутривидовой полиморфизм мтДНК сахалинского тайменя *Parahucho perryi* // Актуальные проблемы биологических наук: материалы I Межрегиональной молодежной школы-конференции, 13–18 мая 2013., Владивосток. – Владивосток: Русский остров, 2013. С. 177–179.
4. **Маляр В.В.**, Скурихина Л.А., Олейник А.Г., Кухлевский А.Д., Брыков Вл.А. Генетическая эволюция сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Salmonidae) и возможные пути его расселения // Современные проблемы биологической эволюции: материалы II Международной конференции. 11–14 марта 2014 г., Москва. – М.: ГДМ, 2014. С. 124–127.
5. **Malyar V.V.**, Brykov V.A. Estimating population divergence time of Sakhalin taimen *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856) // Contributions to the 4<sup>th</sup> Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics» (MolPhy-4), September 23-26, 2014, Moscow. – Moscow: Torus Press. 2014. P. 44.

МАЛЯР ВАСИЛИЙ ВАСИЛЬЕВИЧ

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФИЛОГЕОГРАФИЯ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ РЫБ СЕМЕЙСТВ  
SALMONIDAE И CYPRINIDAE В ЯПОНСКОМ И ОХОТСКОМ МОРЯХ**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук