

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У АНАДРОМНЫХ РЫБ КЕТЫ *ONCORHYNCHUS KETA* (WALBAUM, 1792) И САХАЛИНСКОГО ТАЙМЕНЯ *PARAHUCHO PERRYI* (BREVOORT, 1856) ИЗ СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ ПАЦИФИКИ КАК ОТРАЖЕНИЕ ОСЦИЛЛЯЦИЙ ПАЛЕОКЛИМАТА¹

© 2016 г. В. В. Маляр^{1,2}, Вл. А. Брыков^{1,2}

¹Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041;

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690600

e-mail: thebotkininc@gmail.com

Статья принята к печати 04.02.2016 г.

Исследовано распределение генетической изменчивости двух фрагментов мтДНК в выборках кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) и сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856) из Японского и Охотского морей. Установлено, что значения гаплотипической и нуклеотидной изменчивости у этих видов в целом находятся на одном уровне. Анализ филогенетических деревьев выявил у тайменя четыре этапа дивергентной эволюции, у кеты – три. Первый этап дивергенции у тайменя указывает на время 430 тыс. лет назад, второй – 220 тыс. лет назад, третий – 70 тыс. лет назад. У кеты первый этап дивергенции соответствует 220 тыс. лет назад, второй – около 100 тыс. лет назад. У обоих видов основная доля выявляемых в настоящее время гаплотипов формировалась на протяжении последних 50–10 тыс. лет. На каждом этапе эволюции действовали определенные гляциоэвстатические процессы колебания уровня Мирового океана, которые способствовали географической изоляции. Метод исследования демографической истории популяций позволил рассчитать, что у тайменя начальный этап роста численности приходится на время около 12 тыс. лет назад и, по-видимому, связан с окончанием последнего ледникового максимума. У кеты данный период начался несколько раньше (30–35 тыс. лет назад) и ускорился в последние 10–15 тыс. лет. Последнее оледенение в меньшей степени сказалось на демографических показателях кеты, вероятно, из-за большей эвритермности и большего ареала этого вида.

Ключевые слова: филогеография, кета, сахалинский таймень, коалесцентный анализ, митохондриальная ДНК, северо-западная Пацифика.

Genetic variability in anadromous fishes, chum salmon *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) and Sakhalin taimen *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856), from the northwestern Pacific as a reflection of paleoclimate oscillations. V. V. Malyar^{1,2}, Vl. A. Brykov^{1,2} (¹A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041; ²Far Eastern Federal University, Vladivostok 690600)

The genetic variability distribution of two mtDNA segments of the chum salmon *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) and the Sakhalin taimen *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856) was examined in populations of the Sea of Japan and the Sea of Okhotsk. The values of haplotype and nucleotide variability in these species are, in general, of the same level. The dating of the divergence time of species haplotypes revealed four periods of evolution in Sakhalin taimen and three in chum salmon. In the taimen, the first divergence time was about 430 thousand years (kyr), the second 220 kyr, and the third 70 kyr ago. In the chum, the first divergence time corresponds to 220 kyr, the second is about 100 kyr ago. In the both species, the main portion of presently revealed haplotypes evolved over the past 50–10 kyr. Certain glacioeustatic sea level fluctuations that contributed to geographic isolation operated at each stage of evolution of species. Population demographic history research found that the initial stage of population growth in the taimen occurred about 12 kyr ago and was apparently associated with the end of the Last Glacial Maximum. In the chum, that period began somewhat earlier, 30–35 kyr ago, and has accelerated in the past 10–15 kyr. The last glaciations, to a lesser extent, impacted the demographics of chum salmon, probably due to a greater eurythermy and a larger range of this species. (*Biologiya Morya*, 2016, vol. 42, no. 4, pp. 289–299).

Keywords: phylogeography, chum, Sakhalin taimen, coalescence, mitochondrial DNA, northwestern Pacific.

Значимость исторических и экологических факторов в процессах формирования внутривидовых единиц (популяционно-генетической структуры) и образования новых видов – одна из наиболее важных проблем в эволюционной биологии (Mayr, 1963; Avise, 2000). Определение границ популяций имеет и большое прак-

тическое значение, поскольку популяции являются единицами хозяйственной деятельности человека.

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

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 14-50-00034.

животных, но и у пресноводных и морских рыб (Avisé, 2000). Периоды похолоданий чередовались с потеплениями с интервалом около 100 тыс. лет (Head et al., 2008). В периоды похолоданий формировались ледниковые щиты, существенно снижался уровень океана, большинство видов вытеснялось в южные регионы (рефугии), из которых виды распространялись на север, когда ледники отступали и уровень океана вновь поднимался. Формирование двух и более рефугий приводило к изоляции особей, к снижению или полному прекращению генетического обмена между популяциями. В случае нескольких рефугий вероятность дивергенции изолированных форм и образования двух или более видов увеличивалась. Исторические факторы (фрагментация, экспансия, реколонизация, гибридизация), сопровождавшие изменения ареалов видов под влиянием циклических колебаний климата, также существенно влияли на распределение генетической изменчивости внутри видов (Templeton et al., 1995).

Сравнительный анализ генетической изменчивости внутри близких видов в пределах одного географического региона позволяет определить время дивергенции основных генеалогических линий и выявить наиболее существенные факторы, которые влияли в прошлом или влияют в настоящее время на популяционно-генетическую структуру видов. Благодаря своим свойствам (материнское наследование, быстрая эволюция и отсутствие рекомбинаций) митохондриальная ДНК (мтДНК) представляет собой очень удобную молекулу для эволюционного и популяционного анализа (Brown et al., 1979). Филогеографический подход, основанный на анализе изменчивости мтДНК, оказался полезным для понимания путей и механизмов формирования видов и внутривидовых единиц (Templeton et al., 1995; Avisé, 2000). 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. Филогеографический подход на основе анализа молекулярной изменчивости позволяет реконструировать события дивергентной эволюции внутри видов и групп видов и отнести события дивергентной эволюции к тому или иному историческому периоду, поскольку гипотеза "молекулярных часов" предполагает равномерное накопление нуклеотидных замен в мтДНК во времени (Avisé, 2000).

Регион северо-западной Пацифики интересен тем, что в периоды глубоких климатических изменений заметно менялись основные физические характеристики внутренних Охотского и Японского морей. В периоды снижения уровня океана поступление воды в эти моря через проливы резко уменьшалось или полностью прекращалось, соответственно, менялись их температура и соленость.

Цель настоящей работы – исследование распределения генетической изменчивости во фрагментах мтДНК у двух анадромных видов лососевых рыб: кеты *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) и сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (Brevoort, 1856). Выбор объектов исследования обусловлен тем, что они имеют сходные биологические признаки (анадромность), но при этом кета встречается во всей северной Пацифике, а сахалинский таймень имеет ограниченный ареал распространения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов мтДНК использовали 30 особей кеты: 20 – из популяций материкового побережья (реки Нарва, Киевка) и 10 – из популяций о-ва Сахалин (р. Найба), а также 60 особей сахалинского тайменя: 35 – из популяций материкового побережья (реки Киевка, Максимовка, Тумнин) и 25 – из популяций о-ва Сахалин (Набильский залив, р. Леонидовка, оз. Айнское) (табл. 1, рис. 1). Препараты ДНК получали из фиксированной 96% этанолом мышечной ткани сердца и плавников по стандартной методике с использованием хлороформа и протейназы K (Sambrook et al., 1989).

В качестве исследуемых молекулярно-генетических маркеров были выбраны фрагменты митохондриальных генов *COI* и *cytb*, амплифицированных с использованием праймеров COI-FishF1/COI-FishR1 (Ward et al., 2005) и Fishcytb-F/Trucytcytc-R (Sevilla et al., 2007) при соответствующих условиях полимеразной цепной реакции. После дальнейшей очистки продуктов реакции последовательности секвенировали с помощью набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, v. 3.1) на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США).

Множественное выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых фрагментов генов осуществляли с использованием программного обеспечения MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011) по алгоритму ClustalW (Thompson et al., 1994). Выравненные последовательности генов для каждой особи исследуемых видов объединяли в комбинированные последовательности. Подбор оптимальной модели нуклеотидного замещения для каждого раздела данных осуществляли в программе jModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2012), используя байесовский информационный критерий (BIC).

Для визуализации разных филогрупп мтДНК построены медианные сети гаплотипов в программе SplitsTree4 version 4.12.3 (Huson, Bryant, 2006) по алгоритму MJ (Median-Joining) (Bandelt et al., 1999). В сравнительный анализ гаплотипов кеты включены дополнительные последовательности базы данных GenBank из Канады, о-в Ванкувер (JX960914, JX960807), и Японии, о-в Хоккайдо (JX960915, JX960808) (Crête-Lafrenière et al., 2012). Значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия для каждой популяции, а также распределение различий между гаплотипами (mismatch distribution) рассчитывали с использованием программы DnaSP v5.10 (Librado, Rozas, 2009).

В модуле BEAUti (пакет BEAST 1.8.0) задан диапазон значений скоростей эволюции. Нижний предел скорости накопления мутаций для фрагмента *COI* кеты составил 0.42%, для фрагмента *cytb* – 0.63% за 1 млн. лет соответственно. Для сахалинского тайменя данная граница определена на уровне 0.31% за 1 млн. лет, что соответствует среднему значению

Таблица 1. Основные характеристики выборок кеты *Oncorhynchus keta* и сахалинского тайменя *Parahucho perryi*

№ вы- борки	Популяция, год сбора материала	Число особей	Географическое положение	Число		Разнообразие	
				гаплотипов	полиморфных сайтов	гаплотипическое	нуклеотидное
<i>Oncorhynchus keta</i>							
1	Р. Нарва, 2009	10	Приморье, юго-западное побережье, Японское море	10	14	1.000 ± 0.045	0.00226
2	Р. Киевка, 2009	10	Приморье, западное побережье, Японское море	3	3	0.689 ± 0.104	0.00078
3	Р. Найба, 2009	10	О-в Сахалин, западное побережье, Охотское море	4	6	0.644 ± 0.152	0.00083
<i>Parahucho perryi</i>							
4	Р. Киевка, 1997	6	Приморье, западное побережье, Японское море	2	1	0.333 ± 0.215	0.00028
5	Р. Максимовка, 1997	3	То же	2	1	0.667 ± 0.314	0.00043
6	Р. Тумнин, 1998, 2005, 2007	26	--/--	2	5	0.471 ± 0.063	0.00150
7	Набильский залив, 2005, 2006, 2007	5	О-в Сахалин, восточное побережье, Охотское море	3	14	0.700 ± 0.218	0.00447
8	Р. Леонидовка, 2014	4	О-в Сахалин, юго-восточное побережье, Охотское море	1	0	0.000 ± 0.000	0.00000
9	Оз. Айнское, 2008	16	О-в Сахалин, западное побережье, Японское море	8	10	0.758 ± 0.110	0.00211

скоростей эволюции для всех описанных видов семейства Salmonidae с использованием комбинаций молекулярных маркеров, палеонтологических данных и статистических методов (Crête-Lafrenière et al., 2012). Максимальная граница скорости в анализе установлена на уровне 1.7% за 1 млн. лет (Stepien et al., 2000). При расчете цепей Маркова (MCMC, Markov Chain Monte Carlo) все значения параметра *ucl.d.mean*, использовавшиеся для вторичных калибровочных данных, имели нормальное распределение (Ho, 2007).

Выбор наилучшей модели молекулярных часов из трех основных гипотез (строгие, "свободные" и анализ без молекулярных часов) проводили с помощью попарного сравнения байесовского фактора (BF). Для исследуемых наборов данных положительные достоверные значения (> 1) (Kass, Raftery, 1995) получены при использовании "свободных" часов (relaxed clock).

Реконструкция демографической истории популяций видов на основе молекулярных данных состояла из двух основных этапов. На первом этапе в результате филогенетического анализа установлены внутривидовые генеалогии и датировки событий дивергенции с помощью байесовского подхода (BI) в пакете программ BEAST 1.8.0 (Drummond et al., 2012) при следующих условиях: модель нуклеотидного замещения для последовательностей *COI* кеты – НКУ+I, *cytb* – TrN; для фрагментов генов сахалинского тайменя – НКУ+I, модель молекулярных часов – "свободные" часы с некоррелированным логарифмически нормальным распределением скоростей эволюции относительно ветвей деревьев (uncorrelated lognormal relaxed clock) (Drummond et al., 2006), продолжительность анализа – 30 млн. поколений с отбором каждого тысячного состояния и значением burn-in 10%. Филогенетические деревья, полученные в результате расчетов, суммировали в программе TreeAnnotator (пакет BEAST 1.8.0), используя алгоритм maximum clade credibility (MCC). Топологию деревьев считали достоверной, если значения апостериорных вероятностей (BPP) в узлах составляли 0.95 и выше.

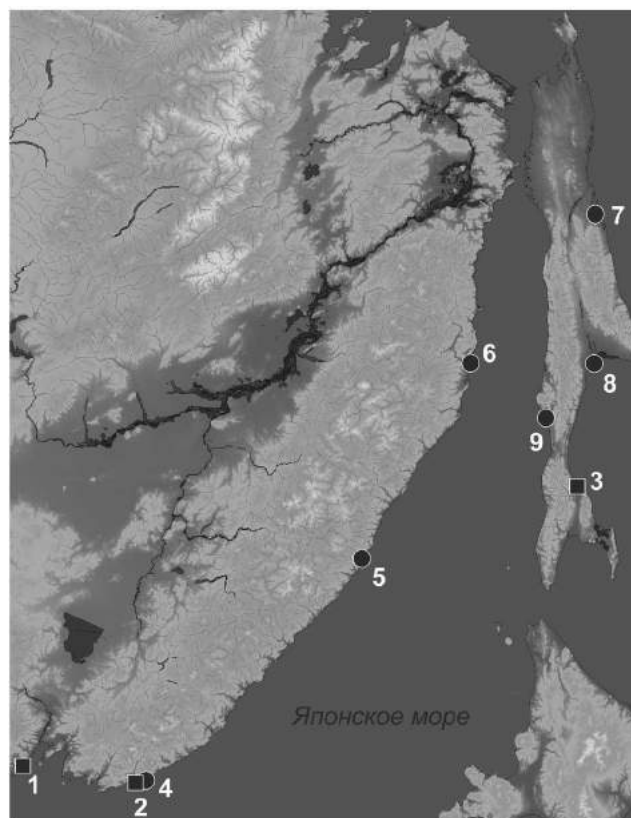


Рис. 1. Локализация исследованных выборок кеты *Oncorhynchus keta* (квадраты) и сахалинского тайменя *Parahucho perryi* (кружки): 1 – р. Нарва, 2 – р. Киевка, 3 – р. Найба, 4 – р. Киевка, 5 – р. Максимовка, 6 – р. Тумнин, 7 – Набильский залив, 8 – р. Леонидовка, 9 – оз. Айнское.

Второй этап заключался в анализе истории популяций на основе данных о внутривидовых генеалогиях. В соответствии с известной методологией (Grant, 2015) с помощью программы BEAST 1.8.0 и условий, описанных выше, построены байесовские скайлайны (Bayesian skyline plot) (Drummond et al., 2005) для популяций исследуемых видов. Количество групп, определяющее степень выравнивания демографических функций скайлайнов, также выбрано на основе BF (Suchard et al., 2001). Для байесовского скайлайна использована кусочно-линейная модель (piecewise-linear model), допускающая линейное изменение эффективной численности популяции на разных коалесцентных интервалах. Вычисления с использованием байесовского подхода проводили на базе высокопроизводительного кластера CIPRES (Miller et al., 2010). Значения показателя ESS (effective sample size) при этом составили более 200. Полученные расчеты анализировали в программе Tracer 1.6.0.

Последовательности фрагментов генов *COI* и *cytb* кеты и сахалинского тайменя депонированы в GenBank под номерами KR607578–KR607600, KR607518–KR607577; KR778850–KR778879, KR778820–KR778849.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Kema Onchorhynchus keta

В результате анализа нуклеотидных последовательностей у изученных особей кеты обнаружено 14 разных гаплотипов мтДНК (табл. 2). Общая длина комбинированных последовательностей мтДНК *COI* и *cytb* составила 1643 нуклеотидные пары. Из 20 переменных сайтов 12 были филогенетически информативными.

Популяция кеты из р. Нарва характеризовалась наибольшим количеством гаплотипов (10). В выборке кеты из р. Киевка обнаружено 3 гаплотипа с относительно высокой частотой, 2 из них – общие с гаплотипами вы-

Таблица 2. Встречаемость гаплотипов мтДНК в исследованных популяциях кеты *Onchorhynchus keta*

Гаплотип	Популяция			Число особей
	р. Нарва	р. Киевка	р. Найба	
Keta1	1(16.7)	5(83.3)	0	6
Keta2	1(33.3)	2(66.7)	0	3
Keta3	1(14.3)	0	6(85.7)	7
Keta4	0	0	2(100)	2
Keta5	0	0	1(100)	1
Keta6	1(100)	0	0	1
Keta7	0	0	1(100)	1
Keta8	1(100)	0	0	1
Keta9	1(100)	0	0	1
Keta10	1(100)	0	0	1
Keta11	1(100)	0	0	1
Keta12	1(100)	0	0	1
Keta13	1(16.7)	0	0	1
Keta14	0	3(100)	0	3

Примечание. В скобках указано относительное число особей каждого гаплогруппы (в %).

борки кеты из р. Нарва. В сахалинской популяции кеты (р. Найба) выявлено 4 гаплогруппы. Наиболее часто был представлен гаплогруппа Keta3, остальные гаплогруппы были характерны только для данной популяции (р. Найба, о-в Сахалин). Гаплогруппы, обнаруженные в популяциях кеты материковых рек Нарва и Киевка, практически не перекрывались с гаплогруппами кеты из р. Найба. Исключением являлся гаплогруппа Keta3, выявленный в выборке кеты из р. Найба и у единственной особи из р. Нарва. Три особи из р. Киевка характеризовались уникальным гаплогруппом Keta14, отмеченным только для данной популяции. Наиболее высокие значения гаплогруппы (1.000 ± 0.045) и нуклеотидной (0.00226) изменчивости выявлены в выборке кеты из р. Нарва. Самые низкие значения определены в выборках кеты из р. Киевка – 0.689 ± 0.104 и 0.00078, а также в сахалинской популяции этого вида (р. Найба) – 0.644 ± 0.152 и 0.00083 соответственно (табл. 1).

Все выявленные гаплогруппы кеты формируют две основные филогруппы с центральными гаплогруппами Keta1 и Keta3, остальные гаплогруппы отличаются от них 1–4 нуклеотидными заменами (рис. 2). Все гаплогруппы из филогруппы Б характерны только для особей из популяций рек Нарва и Киевка. Филогруппа А пятью нуклеотидными заменами отделяется от ближайшего гаплогруппа из материковой группы Б и включает практически всех особей популяции кеты р. Найба (о-в Сахалин). К этой филогруппе относятся также гаплогруппы кеты из Северной Америки (о-в Ванкувер) и Японии (о-в Хоккайдо). Гаплогруппы групп А и Б формируют звездчатые структуры (рис. 2).

Байесовский анализ подтверждает наличие двух четко выраженных филогрупп кеты с достоверным распределением относительно географических регионов. Рассчитанное среднее значение различий между филогруппами указывает на то, что дивергенция началась около 220 тыс. лет назад с 95% интервалом наивысшей апостериорной плотности от 70 до 395 тыс. лет. Внутри каждой филогруппы образуются два кластера. Величины апостериорных вероятностей в узлах близки к достоверным – 0.90 и 0.93 (рис. 3). Рассчитанное время дивергенции внутри кластеров составило 90–110 тыс. лет.

При оценке генетической изменчивости особей кеты с помощью анализа распределения различий между всеми гаплогруппами получена бимодальная кривая распределения (рис. 4А). Ожидаемое распределение гаплогрупп, рассчитанное для популяции с постоянной численностью, отличалось от наблюдаемого. На графике выделяются два пика распределения, связанные с существованием двух разных филогрупп кеты. Анализ графиков байесовских скайлайнов (рис. 5А) показал относительно постоянную численность популяций кеты с момента дивергенции основных филогрупп (220 тыс. лет назад) до отметки 75 тыс. лет. Далее наблюдается постепенный рост численности этого вида, продолжающийся и в настоящее время.

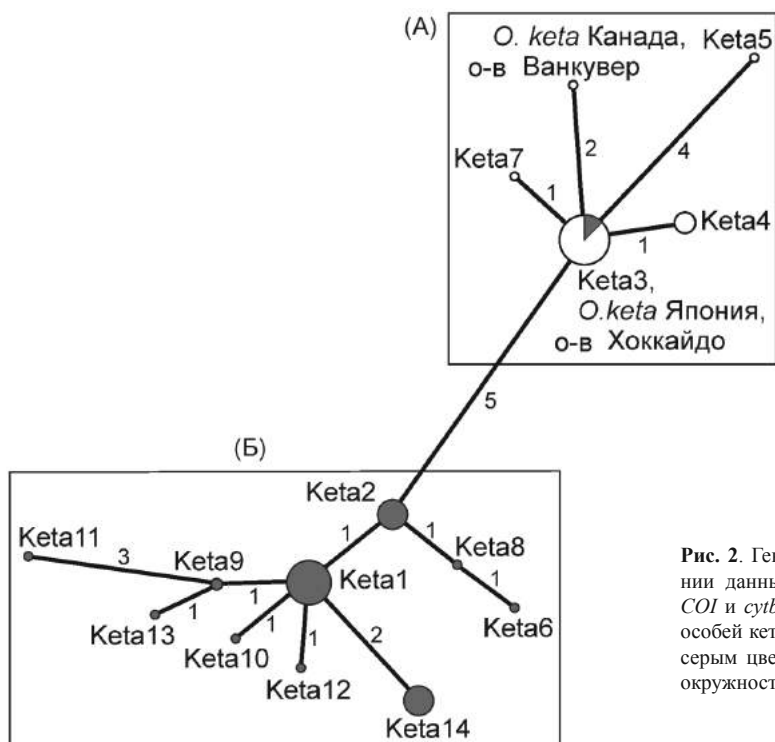


Рис. 2. Генеалогическая сеть гаплотипов, полученная на основании данных анализа нуклеотидных последовательностей генов *COI* и *cytb* мтДНК *Oncorhynchus keta*. А, Б – филогруппы. Доля особей кеты с материкового побережья Японского моря отмечена серым цветом. Обозначения гаплотипов, как в табл. 2; размеры окружностей пропорциональны числу исследованных особей.

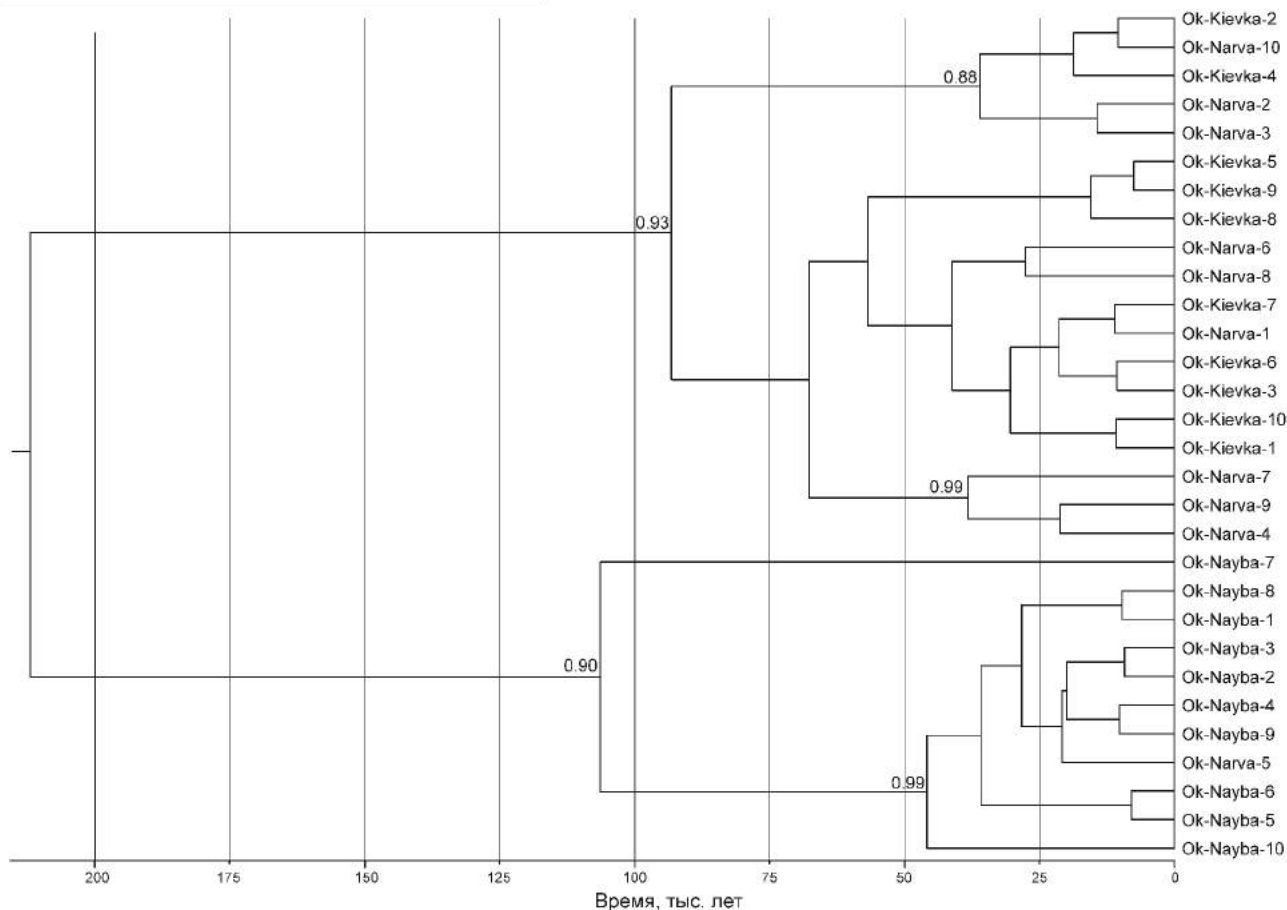


Рис. 3. Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, отражающее генетическую изменчивость популяций и время дивергенции основных генеалогических линий *Oncorhynchus keta* (в тыс. лет) по данным комбинированных последовательностей двух фрагментов мтДНК (*COI* и *cytb*). Справа от узлов дерева – величины апостериорных вероятностей (достоверные ≥ 0.95).

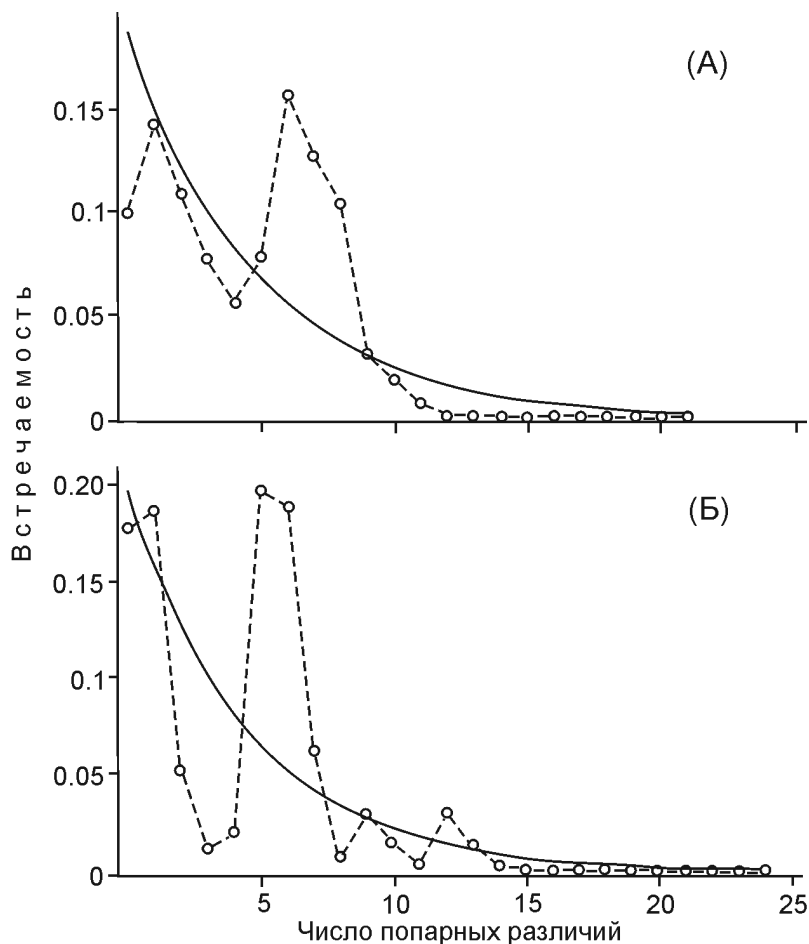


Рис. 4. График распределения различий между гаплотипами (mismatch distribution) *Oncorhynchus keta* (А) и *Parahucho perryi* (Б).

Сахалинский таймень *Parahucho perryi*

При анализе изменчивости нуклеотидных последовательностей у изученных особей сахалинского тайменя из разных выборок выявлено 13 гаплотипов мтДНК (табл. 3). Длина полученных комбинированных последовательностей составила 1565 нуклеотидных пар. Из выделенного 21 варибельного сайта 17 сайтов определены как филогенетически информативные. Во всех выборках тайменя, за исключением выборки из Набильского залива, обнаружен общий гаплотип PP1. Еще один общий гаплотип, PP2, выявлен в материковой популяции р. Тумнин и оз. Айнское (западное побережье о-ва Сахалин). Все остальные гаплотипы были уникальными для той или иной выборки. Выборка из оз. Айнское обладала наибольшим количеством гаплотипов (8), среди них 6 – уникальные. Для этой популяции получено самое высокое значение гаплотипического (но не нуклеотидного) разнообразия – 0.758 ± 0.110 и 0.00211 соответственно (табл. 1). Выборка сахалинского тайменя из Набильского залива содержала 3 уникальных гаплотипа (PP9, PP10, PP11) и характеризовалась высокими значениями гаплотипического (0.700 ± 0.218) и наиболь-

шим значением нуклеотидного (0.00447) разнообразия. В выборке из р. Тумнин 17 особей формировали общую (PP2) филогруппу с выборкой из оз. Айнское. Следует отметить, что в материковых выборках тайменя из рек Киевка и Максимовка выделено по одному уникальному гаплотипу (гаплогруппы PP12 и PP13 соответственно).

Согласно сети гаплотипов, построенной по алгоритму MJ, гаплотипы мтДНК сахалинского тайменя образуют три различающиеся филогруппы (рис. 6). В филогруппе А центральное положение занимает гаплотип PP1, в филогруппе Б – гаплотип PP2, который отличается пятью нуклеотидными заменами. Оба гаплотипа с высокой частотой встречаются в материковых популяциях, но отмечены также и в островных. Филогруппа В представлена единственным гаплотипом PP10, выявленным у особей из Набильского залива, и отличается от ближайшего гаплотипа восемью нуклеотидными заменами.

Топология байесовского дерева отражает обособленность гаплотипов PP10 трех особей тайменя из Набильского залива от других гаплотипов этого вида. Время дивергенции данной филогруппы от остальных составило около 430 тыс. лет (95% интервал наивысшей апостериорной плотности 55 тыс. – 1 млн. лет) (рис. 7).

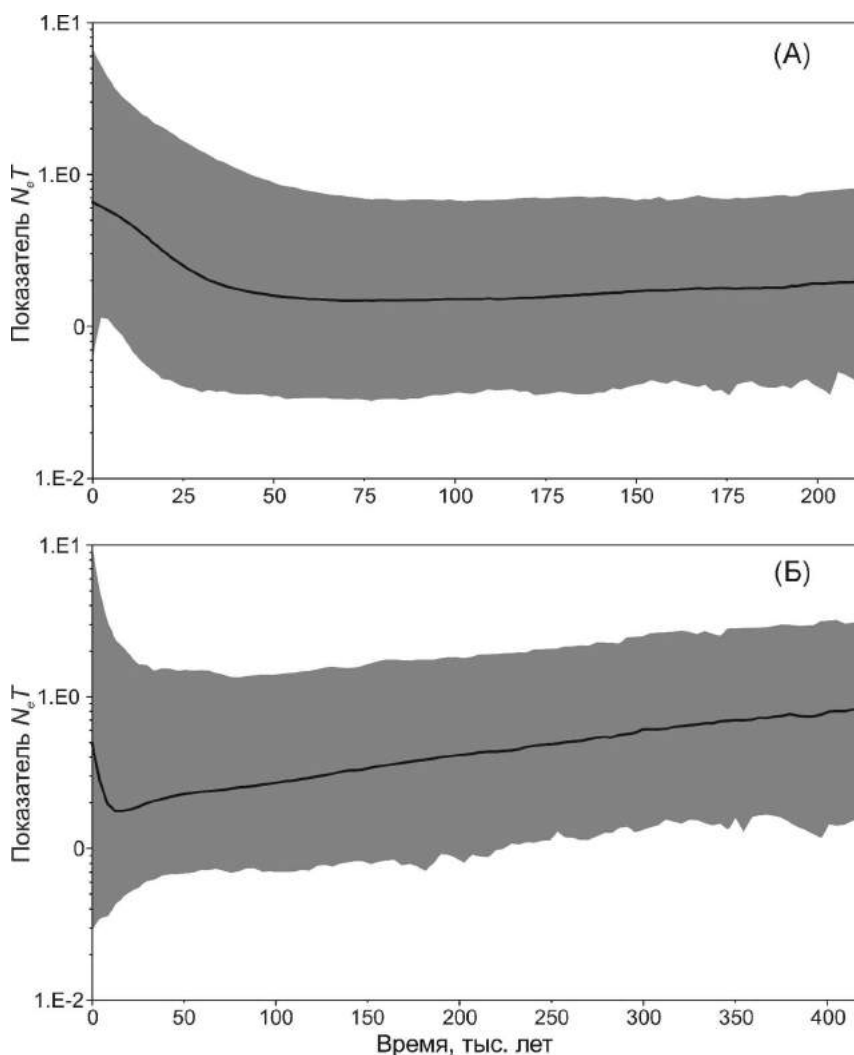


Рис. 5. Байесовский скайлайн, построенный для комбинированных последовательностей мтДНК *Oncorhynchus keta* (А) и *Parahucho perryi* (Б). График показывает изменение показателя N_eT (произведение эффективной численности популяций и продолжительности одного поколения) с течением времени. Сплошная линия – медиана показателя N_eT , затемненный участок – 95% интервал наивысшей апостериорной плотности распределения оценок.

Таблица 3. Встречаемость гаплотипов мтДНК в исследованных популяциях сахалинского тайменя *Parahucho perryi*

Гаплотип	Популяция						Число особей
	р. Киевка	р. Тумнин	р. Максимовка	оз. Айнское	Набильский залив	р. Леонидовка	
PP1	1(6.25)	9(56.25)	1(6.25)	1(6.25)	0	4(25)	16
PP2	0	17(94.4)	0	1(5.6)	0	0	18
PP3	0	0	0	8(100)	0	0	8
PP4	0	0	0	2(100)	0	0	2
PP5	0	0	0	1(100)	0	0	1
PP6	0	0	0	1(100)	0	0	1
PP7	0	0	0	1(100)	0	0	1
PP8	0	0	0	1(100)	0	0	1
PP9	0	0	0	0	1(100)	0	1
PP10	0	0	0	0	3(100)	0	3
PP11	0	0	0	0	1(100)	0	1
PP12	5(100)	0	0	0	0	0	5
PP13	0	0	2(100)	0	0	0	2

Примечание. В скобках указано относительное число особей каждого гаплотипа (в %).

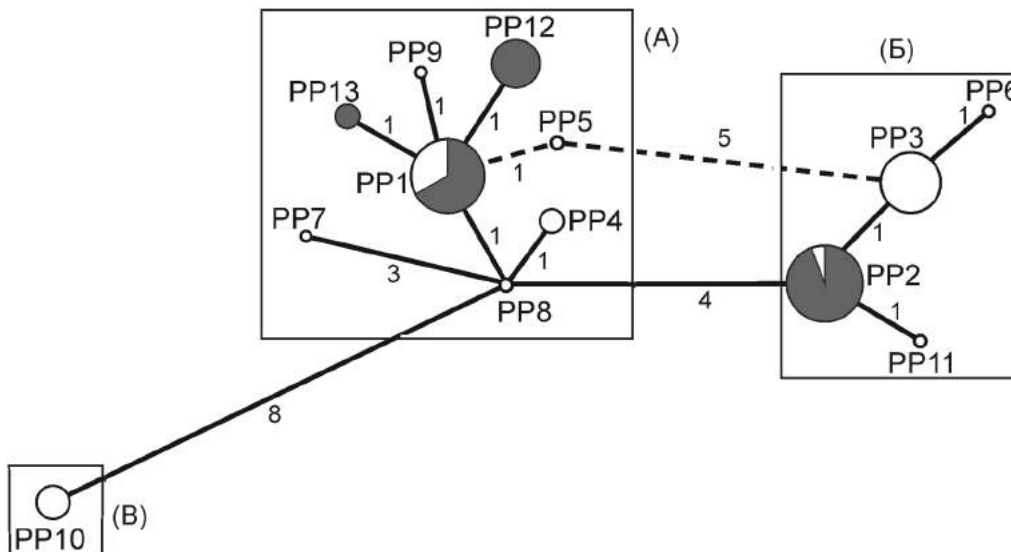


Рис. 6. Генеалогическая сеть гаплотипов, полученная на основании данных анализа нуклеотидных последовательностей генов *COI* и *cytb* мтДНК сахалинского тайменя *Parahucho perryi*. А, Б, В – филогруппы. Доля особей тайменя с материкового побережья Японского моря отмечена серым цветом. Обозначения гаплотипов, как в табл. 3; размеры окружностей пропорциональны числу исследованных особей.

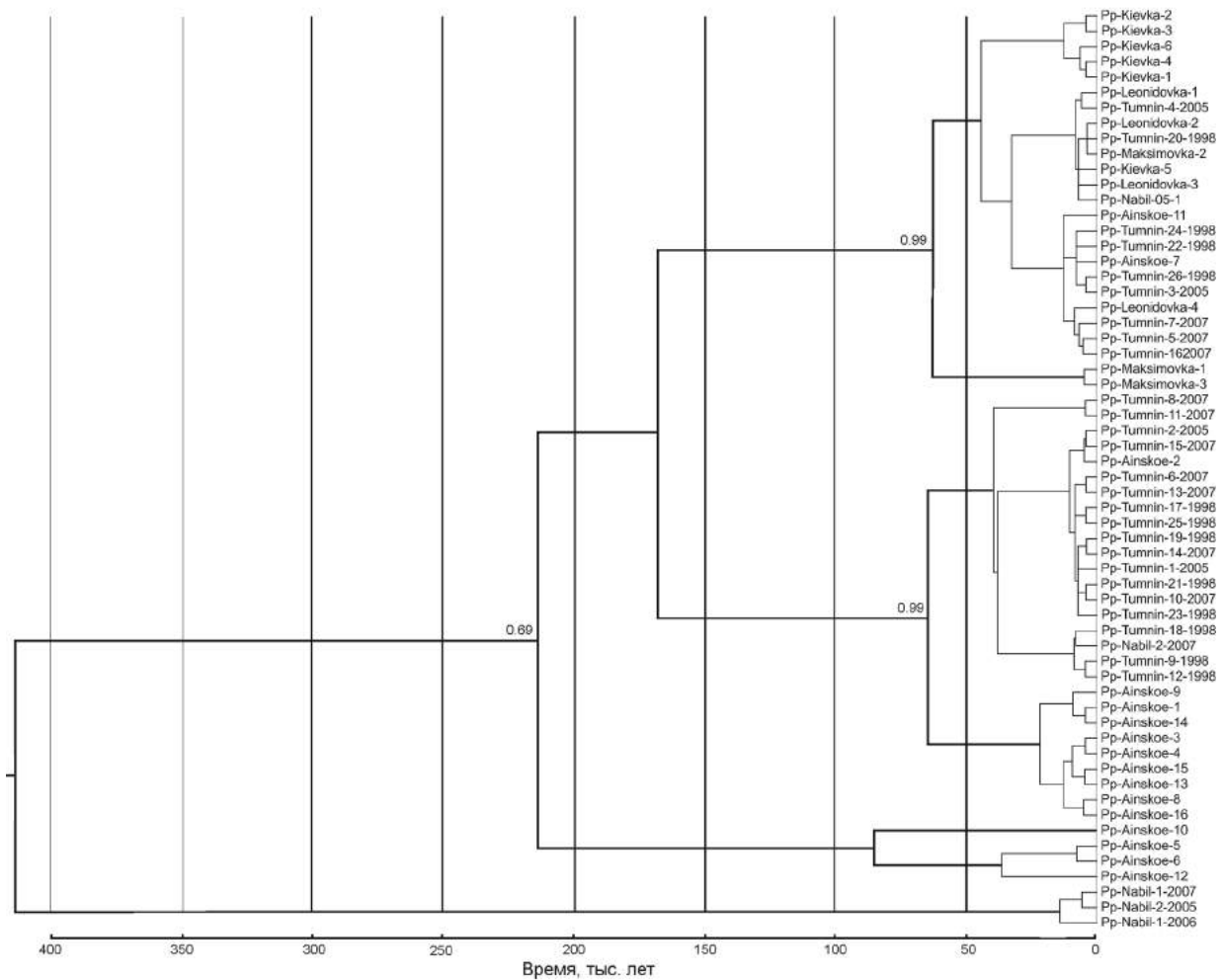


Рис. 7. Байесовское консенсусное филогенетическое дерево, отражающее генетическую изменчивость популяций и время дивергенции основных генеалогических линий *Parahucho perryi* (в тыс. лет) по данным комбинированных последовательностей двух фрагментов мтДНК (*COI* и *cytb*). Справа от узлов дерева – величины апостериорных вероятностей (достоверные ≥ 0.95).

Среди узлов, имеющих достоверные значения апостериорных вероятностей, следует отметить два подразделенных кластера гаплотипов, встречающихся и в материковых, и островных выборках. Разделение этих филогрупп произошло около 80 тыс. лет назад. При оценке генетической изменчивости особей тайменя с помощью анализа распределения различий между всеми гаплотипами получена мультимодальная кривая распределения (рис. 4Б), что связано с наличием нескольких филогрупп.

Байесовский скайлайн отражает устойчивое сокращение эффективной численности популяций сахалинского тайменя на протяжении всей демографической истории вида от момента дивергенции генеалогических линий (430 тыс. лет назад) до периода времени 12–15 тыс. лет назад. После этого периода численность тайменя начинает резко возрастать, хотя и не достигает исходной эффективной численности (рис. 5Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

У двух видов лососевых рыб, кеты *Oncorhynchus keta* и сахалинского тайменя *Parahucho perryi*, разные истории происхождения, свои биологические особенности, разные ареалы распространения и численности. Выборки тайменя были взяты на значительной части ареала обитания этого вида. Для кеты исследованный регион представляет лишь небольшую часть ареала. Тем не менее для обоих видов выявлены сходные закономерности.

Значения гаплотипической и нуклеотидной изменчивости у этих видов различаются (0.9011 ± 0.034 и 0.00266 у кеты, 0.8215 ± 0.03 и 0.00259 у сахалинского тайменя), но в целом остаются на одном уровне. Очевидно, что относительно высокий уровень гаплотипической изменчивости у тайменя определяется более длительным временем существования вида. По разным оценкам, время происхождения этого вида находится в пределах от 23 (Шедько и др., 2013) до 30 млн. лет (Alexandrou et al., 2013). Кета как вид существует гораздо меньше времени (4–6 млн. лет) (Crête-Lafrenière et al., 2012; Alexandrou et al., 2013), но её высокая численность и внутривидовая подразделенность, как следствие "хотинга", определяют высокий уровень изменчивости.

Сходство обнаруживается и при сравнительном анализе гаплотипических сетей и филограмм гаплотипов этих видов. Для обоих видов характерно наличие, по крайней мере, двух больших филогрупп гаплотипов (рис. 2, 6). Моделирование показывает, что стохастическое образование двух филогрупп в панмиксной популяции возможно, но это крайне маловероятное событие (Marjoram, Donnelly, 1994). Более вероятной причиной существования двух филогрупп считается наличие в прошлой истории вида двух популяций с ограниченным генетическим обменом. Длительное независимое существование таких популяций приводит к накоплению в них преимущественно нейтральных мутаций и, в результате, к дивергенции филогрупп. Из наших данных следу-

ет, что у кеты филогруппы в значительной степени разделены в пространстве. Все гаплотипы (1, 2, 6, 8, 9–14) группы Б обнаружены в япономорских материковых популяциях, большая часть гаплотипов (4, 5, 7) группы А найдена в охотоморской выборке. Этот факт подтверждает, что формирование филогрупп определялось существованием в прошлой истории вида изолированных популяций. Близость гаплотипов особей из Северной Америки и Японии, а также исследуемых филогрупп кеты согласуется с данными, приведенными в работе Юна с соавторами (Yoon et al., 2008). Выявленные ими частоты гаплотипов контрольного региона мтДНК отражают направление распространения кеты по побережью северо-западной Пацифики от вероятного места происхождения в акватории Японского моря и прилегающих территорий до Северной Америки. Авторы отмечают, что процессы распространения кеты могли быть вызваны климатическими изменениями в плейстоцене (Yoon et al., 2008).

Закономерность образования в этом регионе двух и более филогрупп у пресноводных и морских рыб подтверждается существованием двух филогрупп у двух эндемичных видов красноперок рода *Tribolodon* (Брыков и др., 2013), осетра (Шедько и др., 2015), минтая (Горбачев и др., 2014) и симы (Yu et al., 2010).

Распределение нуклеотидных различий между всеми гаплотипами у обоих видов, как и предполагалось, имеет двухвершинный характер (рис. 4). Первый пик приходится на различия в 1 нуклеотид, второй – в 5–6 нуклеотидов. Общность распределения свидетельствует о сходстве факторов, определявших формирование филогрупп у видов. У тайменя присутствуют дополнительные пики в области 9 и 12 нуклеотидов. Эти пики обусловлены наличием значительно отличающихся гаплотипов, выявленных на севере о-ва Сахалин, которые с высокой поддержкой объединяются в отдельную кладу (рис. 7). Пик со средним различием в 1 нуклеотид соответствует звездобразному распределению гаплотипов в каждой филогруппе вокруг центрального гаплотипа. Пик с различиями в 5–6 нуклеотидов отражает средние различия между гаплотипами в филогруппах. Звездобразное распределение гаплотипов вокруг центральных, наиболее часто встречающихся гаплотипов каждой из филогрупп свидетельствует о недавнем резком увеличении численности вида (Yoon et al., 2008). Наличие альтернативной связи (рис. 6) между гаплотипами сахалинского тайменя может быть результатом гомоплазии, а именно повторных и обратных мутаций в мтДНК (Churikov et al., 2001).

При анализе байесовских филограмм особей популяций у сахалинского тайменя выявляется четыре этапа дивергентной эволюции (рис. 7), у кеты – три (рис. 3). Первый этап дивергенции у тайменя приходится на время 430 тыс. лет назад, второй – 220 тыс. лет назад, третий – 70 тыс. лет назад. Заметим, что период в 170 тыс. лет, отмеченный на филограмме, имеет сравнительно низкое значение апостериорной вероятности и не рас-

смагивается в работе как отдельный этап дивергентной эволюции. У кеты первый этап дивергенции соответствует 220 тыс. лет назад, второй – около 100 тыс. лет назад. Основная доля выявляемых в настоящее время гаплотипов у обоих видов формировалась 50–10 тыс. лет назад (четвертый и третий этапы дивергенции соответственно).

Чем могут определяться этапы дивергентной эволюции? Наиболее значимыми в истории северной Пацифики были осцилляции климата с периодом около 100 тыс. лет (Miller et al., 2011). Похолодание и наступление ледников, снижение уровня океана и частичная или полная изоляция от океана с опреснением внутренних Японского и Охотского морей могли быть основными факторами, определяющими этапы дивергенции (Брыков, Подлесных, 2001; Gharrett et al., 2001; Баланов и др., 2004; Скурихина и др., 2013). Климатические изменения в плейстоцене обусловили такие изменения на поверхности Земли, как перераспределение воды между океаном и ледниками, обводнение или иссушение бассейнов рек, крупные перестройки речной сети, формирование бухт и заливов (Каплин, Селиванов, 1999).

Первый этап формирования отдельных филогрупп у тайменя приходится на миндельский (окский) ледниковый период (478–424 тыс. лет назад). Уровень Японского моря у берегов о-ва Сахалин в результате регрессии минделя понизился до отметок около 100 м ниже современного (Korotky et al., 1997). Еще один период дивергенции мтДНК у обоих исследованных видов приходится на рисский (днепровский) ледниковый период (347–130 тыс. лет назад). Рисский ледник вызвал регрессии, сформировавшие берег Японского моря на отметке около 140–150 м ниже современного. Следующие два периода дивергенции исследуемых видов совпадают с вюрмским (валдайским) оледенением (110–12 тыс. лет назад). В регионе отмечались значительные регрессии около 50 и 25 тыс. лет назад (Korotky et al., 1997).

Последний этап "взрывного" образования гаплотипов (50–10 тыс. лет назад), очевидно, связан с отступлением ледников и расширением ареалов у обоих видов в голоцене. Важнейшими событиями рубежа плейстоцена и голоцена стало формирование 13–12 тыс. лет назад прол. Лаперуза, 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).

Метод исследования демографической истории популяций (байесовский скайлайн) позволил рассчитать, что у тайменя начальный этап роста численности приходится на время около 12 тыс. лет назад (рис. 5Б). У кеты этот период начался 30–35 тыс. лет назад и ускорился в последние 10–15 тыс. лет (рис. 5А). У тайменя период роста численности хорошо согласуется с окончанием последнего ледникового максимума (26.5–19 тыс. лет

назад) в составе вюрмского оледенения. Можно предположить, что последнее оледенение в меньшей степени сказалось на демографических показателях кеты, обладающей большей эвритермностью и большим ареалом. Сахалинский таймень имеет ограниченный ареал, очевидно, его распространение определяется более узким диапазоном устойчивости к температурам и большей привязанностью к эстуарным участкам морей, что объясняет данные различия (Семенченко, Золотухин, 2011; Fukushima et al., 2011).

Характерные морские отложения северовосточного побережья о-ва Сахалин показывают, что уровень моря в голоцене приблизился к современному сравнительно рано – около 11 тыс. лет назад (Василевский, 2008). На побережье Приморья в результате трансгрессий голоценового межледниковья морские воды вторгались в переуглубленные в плейстоцене речные долины и образовывали изолированные бухты с исчерченной береговой линией. Эти изоляции также увеличивали накопление генетической изменчивости.

Авторы статьи выражают искреннюю признательность А.Г. Олейник, Л.А. Скурихиной за предоставление материала для исследования и А.Д. Кухлевскому за помощь при секвенировании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баланов А.А., Кухлевский А.Д., Брыков Вл.А. *Sebastes flammeus* (Jordan et Starks, 1904) – младший синоним *S. iracundus* (Jordan et Starks, 1904) с описанием рыб из южной части Охотского моря // *Вопр. ихтиологии*. 2004. Т. 44, № 1. С. 5–14.
- Брыков Вл.А., Подлесных А.В. Сравнение митохондриальной ДНК у двух видов терпугов и их гибридов (сем. Hexagrammidae; Pisces) из залива Петра Великого (Японское море) // *Генетика*. 2001. Т. 37, № 12. С. 1663–1666.
- Брыков Вл.А., Полякова Н.Е., Семина А.В. Сравнительный анализ изменчивости митохондриальной ДНК у четырех видов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) // *Генетика*. 2013. Т. 49, № 3. С. 355–365.
- Василевский А.А. Каменный век острова Сахалин. Южно-Сахалинск: Сахалин. кн. изд-во. 2008. 412 с.
- Горбачев В.В., Латинский А.Г., Прикоки О.В., Соловчук Л.Л. Моделирование динамики эффективной численности минтая Охотского моря в голоцене на основании изменчивости локусов *Nd2* и *cytb* мтДНК // *Генетика*. 2014. Т. 50, № 7. С. 868–873.
- Каплин П.А., Селиванов А.О. Изменения уровня морей России и развитие берегов: прошлое, настоящее, будущее. М.: ГЕОС. 1999. 299 с.
- Семенченко А.Ю., Золотухин С.Ф. Эффективность воспроизводства сахалинского тайменя *Parahucho perryi* в реках острова Сахалин и стратегия его охраны // *Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова*. Вып. 5. Владивосток: Дальнаука. 2011. С. 472–482.
- Скурихина Л.А., Олейник А.Г., Кухлевский А.Д., Мальяр В.В. Внутривидовой полиморфизм мтДНК сахалинского тайменя *Parahucho perryi* // *Генетика*. 2013. Т. 49, № 9. С. 1065–1078.

- Шедько С.В., Мирошниченко И.Л., Немкова Г.А. Филогения лососевых рыб (Salmoniformes: Salmonidae) и её молекулярная датировка: анализ мтДНК-данных // Генетика. 2013. Т. 49, № 6. С. 718–734.
- Шедько С.В., Мирошниченко И.Л., Немкова Г.А. и др. Изменчивость митохондриальной ДНК, историческая демография и популяционная структура амурского осетра *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 // Генетика. 2015. Т. 51, № 2. С. 200–217.
- Alexandrou M.A., Swartz B.A., Matzke N.J., Oakley T.H. Genome duplication and multiple evolutionary origins of complex migratory behavior in Salmonidae // Mol. Phyl. Evol. 2013. Vol. 69, no. 3. P. 514–523.
- Avise J.C. Phylogeography. The history and formation of species. Cambridge, Mass.: Harvard Univ. Press. 2000. 447 p.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. Vol. 16. P. 37–48.
- Brown W.M., George M. Jr., Wilson A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979. Vol. 76. P. 1967–1971.
- Churikov D., Matsuoka M., Luan X. et al. Assessment of concordance among genealogical reconstructions from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) // Mol. Ecol. 2001. Vol. 19. P. 2329–2339.
- Crête-Lafrenière A., Weir L.K., Bernatchez L. Framing the Salmonidae family phylogenetic portrait: a more complete picture from increased taxon sampling // PLoS One. 2012. Vol. 7, no. 10. P. e46662.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nat. Meth. 2012. Vol. 9, no. 8. 772 p.
- Drummond A.J., Ho S.Y.W., Phillips M.J., Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence // PLoS Biol. 2006. Vol. 4, no. 5. P. e88.
- Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B., Pybus O.G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences // Mol. Biol. Evol. 2005. Vol. 22. P. 1185–1192.
- Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the Beast 1.7 // Mol. Biol. Evol. 2012. Vol. 29. P. 1969–1973.
- Fukushima M., Shimazaki H., Rand P.S., Kaeriyama M. Reconstructing Sakhalin taimen *Parahucho perryi* historical distribution and identifying causes for local extinctions // Trans. Amer. Fish. Soc. 2011. Vol. 140. P. 1–13.
- Gharrett A.J., Gray A.K., Brykov V.I.A. Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA variation in Alaskan coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* // Fish. Bull. 2001. Vol. 99. P. 528–544.
- Grant W.S. Problems and cautions with sequence mismatch analysis and bayesian skyline plots to infer historical demography // J. Hered. 2015. Vol. 106, no. 4. P. 333–346.
- Head M.J., Pillans B., Farquhar S.A. The Early–Middle Pleistocene transition: characterization and proposed guide for the defining boundary // Episodes. 2008. Vol. 31, no. 2. P. 255–259.
- Ho S.Y.W. Calibrating molecular estimates of substitution rates and divergence times in birds // J. Avian Biol. 2007. Vol. 38, no. 4. P. 409–414.
- Huson D.H., Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies // Mol. Biol. Evol. 2006. Vol. 23, no. 2. P. 254–267. <http://www.splittree.org/>
- Kass R.E., Raftery A.E. Bayes factors // J. Am. Stat. Assoc. 1995. Vol. 90, no. 430. P. 773–795.
- Korotky A., Grebennikova T., Razjigaeva N. et al. Marine terraces of Western Sakhalin Island // Catena. 1997. Vol. 30, no. 1. P. 61–81.
- Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. P. 1451–1452.
- Marjoram P., Donnelly P. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution // Genetics. 1994. Vol. 136, no. 2. P. 673–683.
- Mayr E. Animal species and evolution. Cambridge, Mass.: Harvard Univ. Press. 1963. 797 p.
- Miller K., Mountain G., Wright J., Browning J. A 180-million-year record of sea level and ice volume variations from continental margin and deep-sea isotopic records // Oceanography. 2011. Vol. 24, no. 2. P. 40–53.
- Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees // Proc. of the Gateway Computing Environments Workshop. 2010. P. 1–8.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual // New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1989. 1626 p.
- Sevilla R.G., Diez A., Noren M. et al. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes // Mol. Ecol. Notes. 2007. Vol. 7. P. 730–734.
- Stepien C.A., Dillon A.K., Patterson A.K. Population genetics, phylogeography, and systematics of the thornyhead rockfish (*Sebastolobus*) along the deep continental slopes of the North Pacific Ocean // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2000. Vol. 57. P. 1701–1717.
- Suchard M.A., Weiss R.E., Sinsheimer J.S. Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models // Mol. Biol. Evol. 2001. Vol. 18. P. 1001–1013.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. Vol. 28, no. 10. P. 2731–2739.
- Templeton A.R., Routman E., Phillips C.A. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographic distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum* // Genetics. 1995. Vol. 140. P. 767–782.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H. et al. DNA barcoding Australia's fish species // Phil. Trans. Roy. Soc. B. 2005. Vol. 360, no. 1462. P. 1847–1857.
- Yoon M., Sato S., Seeb J.E. et al. Mitochondrial DNA variation and genetic population structure of chum salmon *Oncorhynchus keta* around the Pacific Rim // J. Fish Biol. 2008. Vol. 73, no. 5. P. 1256–1266.
- Yu J.N., Azuma N., Yoon M. et al. Population genetic structure and phylogeography of masu salmon (*Oncorhynchus masou masou*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses // Zool. Sci. 2010. Vol. 27, no. 5. P. 375–385.