

УДК 575.86:597.553.2

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ САХАЛИНСКОГО ТАЙМЕНЯ *Parahucho perryi* ПО ДАННЫМ PCR-RFLP-АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

© 2008 г. А. Г. Олейник, Л. А. Скурихина

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Владивосток 690041; e-mail: alla_oleinik@mail.ru

Поступила в редакцию 26.09.2007 г.

Проведен RFLP-анализ трех амплифицированных фрагментов мтДНК (*Cytb/D-loop*, ND1/ND2, ND3/ND4L/ND4) следующих таксонов: *Parahucho perryi*, *Hucho taimen*, *Brachymystax lenok*, *B. tumentensis*, *Salmo salar*, *Salvelinus leucomaenis*, *S. levanidovi*. Показано значительное снижение показателей гаплотипического и нуклеотидного разнообразия мтДНК *P. perryi* в результате действия случайного дрейфа генов вследствие сокращения величины эффективной численности популяций. Определены оценки дивергенции нуклеотидных последовательностей между гаплотипами мтДНК. Сахалинский таймень *P. perryi* примерно в одинаковой степени дивергировал от *S. salar* и гольцов рода *Salvelinus* – на 11.0 и 10.0% соответственно. Дивергенция между *P. perryi* и *H. taimen* составила 14.6%, между *P. perryi* и ленками рода *Brachymystax* – 14.2%, между *H. taimen* и *Brachymystax* – 7.7%. Проведен анализ вероятных филогенетических связей мтДНК *P. perryi* в группе представленных таксонов и подтверждается валидность рода *Parahucho*. Результаты филогенетических реконструкций свидетельствуют, что деревья, построенные для объединенного по трем фрагментам мтДНК комплекса филогенетически информативных признаков, оказались намного устойчивее деревьев, построенных для индивидуальных генов.

Исследование малочисленных видов, имеющих ограниченный ареал распространения, всегда представляет определенные трудности. Именно к таким видам относится сахалинский таймень *Parahucho perryi*, который является наименее изученным и наиболее спорным таксоном в семействе Salmonidae. На основании данных по морфологии, экологии и географическому распространению сахалинский таймень был выделен в отдельный подрод *Parahucho* [1–8]. Анализ кариотипов ленков и тайменей подтвердил уникальное положение *P. perryi*, в результате чего было предложено рассматривать *Parahucho* в ранге рода [9]. Одновременно обосновывалась гипотеза, согласно которой *P. perryi* является наиболее архаичной формой из ныне живущих лососевых рыб, единственным представителем подсемейства Parahuchoninae [6]. Этот вывод не был поддержан всеми исследователями и филогенетическое положение *P. perryi*, а также возможная парафилия рода *Hucho* все еще активно дискутируются [5, 7, 10, 11]. Последняя проблема возникла тогда, когда появились данные, что представители родов *Hucho* и *Brachymystax* оказываются более близки друг к другу, чем *Hucho* и *Parahucho* [1, 4, 6, 11]. В этом случае включение *P. perryi* (даже в ранге подрода) в род *Hucho* приводит к образованию парафилетического таксона.

Исследование нуклеотидных последовательностей мтДНК значительно расширило возмож-

ности для филогенетического анализа, в том числе и таксонов разного ранга в сем. Salmonidae. Тем не менее работ, в которых анализировалась бы мтДНК *P. perryi*, крайне мало [12–15]. Представление о внутривидовой генетической изменчивости *P. perryi* ограничено двумя работами по аллозимному анализу [4, 16]. Возможно, что в дальнейшем более успешно будет применяться методика анализа полиморфизма микросателлитных локусов [17].

В данной работе мы попытались оценить внутривидовую изменчивость мтДНК и вероятные филогенетические связи сахалинского тайменя *P. perryi* по результатам PCR-RFLP-анализа трех фрагментов мтДНК (*Cytb/D-loop*, ND1/ND2, ND3/ND4L/ND4). Учитывая, что большинство митохондриальных генов, включенных в эти фрагменты, никогда не исследовались у *P. perryi*, полученные результаты представляют определенный интерес и прежде всего для осознания эволюционных возможностей адаптации вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован материал из коллекции авторов, собранный в разные годы в реках Дальнего Востока. Исследовалась мтДНК следующих таксонов: сахалинский таймень *Parahucho perryi* (Brevoort), таймень *Hucho taimen* (Pallas), острорылый ленок *Brachymystax lenok* (Pallas) (согласно

Таблица 1. Основные характеристики выборок

Таксон	Популяция	Широта	Долгота	Объем выборки
<i>Parahucho perryi</i>	р. Киевка (западное побережье Японского моря)	43°06'N	134°17'E	6
<i>P. perryi</i>	р. Тумнин (западное побережье Японского моря)	49°11'N	140°21'E	10
<i>P. perryi</i>	р. Максимовка (западное побережье Японского моря)	46°05'N	137°54'E	3
<i>Hucho taimen</i>	р. Манома (бассейн р. Амур)	49°21'N	137°24'E	2
<i>H. taimen</i>	р. Аричи (бассейн р. Амур)	49°27'N	136°50'E	5
<i>Brachymystax lenok</i>	р. Манома (бассейн р. Амур)	49°21'N	137°24'E	2
<i>B. lenok</i>	р. Аричи (бассейн р. Амур)	49°27'N	136°50'E	2
<i>Brachymystax tumensis</i>	р. Манома (бассейн р. Амур)	49°21'N	137°24'E	5
<i>B. tumensis</i>	р. Анюй (бассейн р. Амур)	49°17'N	137°55'E	1
<i>B. tumensis</i>	р. Аричи (бассейн р. Амур)	49°27'N	136°50'E	1
<i>Salmo salar</i>	р. Тессема, п-ов Таймыр	77°19'N	102°31'E	3
<i>Salvelinus leucomaenis</i>	зал. Измены, о-в Кунашир	43°43'N	145°28'E	10
<i>Salvelinus levanidovi</i>	р. Яма (северное побережье Охотского моря)	59°41'N	154°06'E	13

[18]), тупорылый ленок *Brachymystax tumensis* (Mori) (согласно [18]), атлантический лосось *Salmo salar* (L.), кунджа *Salvelinus leucomaenis* (Pallas), голец Леванидова *Salvelinus levanidovi* Chereshev, Scopetz, Gudkov (табл. 1).

Индивидуальные препараты тотальной ДНК получали из фиксированных тканей печени и сердца по стандартной методике [19]. Изменчивость мтДНК исследовали, используя рестрикционный анализ трех амплифицированных в полимеразной цепной реакции фрагментов, один из которых включает ген цитохрома *b* и регуляторный участок (*Cytb/D-loop*), а два других кодируют пять субъединиц надоксиддегидрогеназы (ND1/ND2, ND3/ND4L/ND4). Праймерные последовательности для использованных нами фрагментов, положение их на карте мтДНК и условия амплификации приведены в работе [20]. Каждый из амплифицированных фрагментов анализировали набором из 17 рестрикционных ферментов в условиях, рекомендованных изготовителем ("MBI Fermentas", Lithuania; "СибЭнзим", Россия): *AsuI*, *AvaI*, *AvaII*, *BstNI*, *BstUI*, *BsuRI*, *DdeI*, *HinfI*, *HhaI*, *MboI*, *MboII*, *MspI*, *RsaI*, *SspI*, *StyI*, *TaqI*, *VspI*. Подробно методика анализа изложена ранее [21].

Для филогенетического анализа были сформированы четыре матрицы данных, отдельно по каждому из трех амплифицированных фрагментов и суммарно для мтДНК в целом. Бинарные матрицы присутствия–отсутствия рестрикционных сайтов для комбинированных гаплотипов создавали с помощью программы GENERATE, повторяющиеся гаплотипы объединяли с помощью программы GROUP в пакете REAP [22]. Для рас-

чета генетических дистанций использовали стандартные и модифицированные оценки нуклеотидной дивергенции между гаплотипами мтДНК [23, 24]. Полученные оценки использовали для филогенетического анализа методом невзвешенной парно-групповой средней связи (UPGMA [25]) и методом присоединения к ближайшему соседу (NJ [26]). Устойчивость кластеризации оценивали в 1000 итераций бутстреп-анализа [27]. Расчеты нуклеотидной дивергенции, кластеризацию гаплотипов и оценку полученных топологий дендрограмм выполняли с использованием филогенетического пакета PHYLIP 3.67 [28] (программы RESTDIST, SEQBOOT, NEIGHBOR, CONSENSE) (<http://evolution.qs.washington.edu/phylip.html>).

Филогенетический анализ методом максимальной экономии (MP) для каждого набора признаков был выполнен с использованием пакетов программ PAUP version 4.0b10 [29] и PHYLIP 3.67. Программа в пакете PAUP выполняла эвристический поиск оптимального дерева (опции TBR и MulTrees) в 100 повторностях с ограничением максимально возможного числа деревьев до 1000. Устойчивость полученных точек ветвления оценивали непараметрическим бутстреп-анализом, который включал 1000 итераций для каждого набора данных. В случае, когда не удалось обнаружить одного лучшего дерева, различия между альтернативными топологиями оценивали с помощью теста Темплетона [30] (пакет PAUP). Поиск оптимального MP-дерева также был выполнен по алгоритму программы PENNY [31], среди 1000 псевдослучайных реплик, полученных из исходной матрицы в программе SEQBOOT (PHYLIP

Таблица 2. Сравнительные характеристики показателей изменчивости мтДНК: анализ участков *Cytb/D-loop*, ND1/ND2, ND3/ND4L/ND4

Таксон	Число особей	Число гаплотипов	Число полиморфных сайтов	Оценка различий между гаплотипами	Гаплотипическое разнообразие <i>h</i>	Нуклеотидное разнообразие π
<i>P. perryi</i>	19	3	2	0.6199 ± 0.5103	0.5731 ± 0.0614	0.00108
<i>H. taimen</i>	7	4	7	3.0476 ± 1.8005	0.8095 ± 0.1298	0.00531
<i>B. lenok</i>	4	4	12	6.3333 ± 3.8011	1.0000 ± 0.1768	0.01103
<i>B. tumensis</i>	7	7	31	10.000 ± 5.2131	1.0000 ± 0.0764	0.01742
<i>S. salar</i>	3	2	3	2.0000 ± 1.5185	0.6667 ± 0.3143	0.00348
<i>S. leucomaenis</i>	10	4	14	3.4222 ± 1.9091	0.5333 ± 0.1801	0.00596
<i>S. levanidovi</i>	13	8	24	7.7948 ± 3.8822	0.8846 ± 0.0699	0.01358

Таблица 3. Сравнительная характеристика изменчивости в трех участках мтДНК *P. perryi*

Участок мтДНК	Число особей	Число гаплотипов	Число сайтов	Полиморфные сайты	Оценка различий между гаплотипами	Гаплотипическое разнообразие <i>h</i>	Нуклеотидное разнообразие π
<i>Cytb/D-loop</i>	19	3	208	2	0.6199 ± 0.5103	0.5731 ± 0.0614	0.00298
ND1/ND2	19	1	199	0	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.00000
ND3/ND4L/ND4	19	1	167	0	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.00000

3.67). Графическое изображение всех дендрограмм было получено в программе TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

Основные показатели генетической изменчивости определяли для каждого из трех амплифицированных фрагментов и по мтДНК в целом с использованием пакетов программ REAP и Arlequin vers. 2.000 [32]. Внутрипопуляционный полиморфизм оценивали, рассчитывая усредненную оценку различий между всеми парами гаплотипов в выборке [33], величины нуклеотидного (π) и гаплотипического (*h*) разнообразия [34, 35]. Гетерогенность частот гаплотипов в выборках *P. perryi* оценивалась методом Монте-Карло по результатам 10000 псевдослучайных реплик [36].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ внутривидовой изменчивости сахалинского тайменя *P. perryi*

Размер амплифицированных фрагментов мтДНК равен 7814 парам нуклеотидов. Общее число сайтов, определенных из анализа размеров и распределения рестриционных фрагментов в гаплотипах, равно 574, что составляет около 2300 нуклеотидов (или 13.8% митохондриального генома). У 63 исследованных особей было выявлено 32 гаплотипа мтДНК. Общих гаплотипов у анализируемых таксонов не обнаружено. Сравнительные характеристики показателей изменчивости приведены в табл. 2.

Среди исследованных таксонов для *P. perryi* характерны одни из самых низких показателей ге-

нетического разнообразия. Гаплотипический состав выборки сахалинского тайменя представлен тремя гаплотипами, усредненная попарная оценка различий между которыми меньше единицы. Очевидно, что малое число нуклеотидных замен между гаплотипами определяет низкие показатели нуклеотидного разнообразия (0.00108) объединенной выборки сахалинского тайменя (табл. 2). Анализ распределения изменчивости в исследованной части генома *P. perryi* показал, что уровень полиморфизма определяет *Cytb/D-loop*. Фрагменты ND1/ND2 и ND3/ND4L/ND4 оказались полностью мономорфными (табл. 3).

Если низкие показатели генетического разнообразия *S. leucomaenis* (табл. 3) связаны с ошибкой выборки и полученные оценки, вероятно, не отражают действительный уровень разнообразия мтДНК [37], то низкие оценки разнообразия *P. perryi* нельзя связывать исключительно с небольшим объемом выборки. Выявленный уровень сопоставим с оценками, полученными ранее на основе RFLP-анализа мтДНК [12]. Кроме того, снижение генетического разнообразия у сахалинского тайменя наблюдается не только по митохондриальным, но и по ядерным генам [4, 16]. Согласно результатам аллозимного анализа *P. perryi* характеризуется крайне низкими значениями средней гетерозиготности, процента полиморфных локусов и средним числом аллелей на локус. Только в одной из четырех исследованных популяций *P. perryi* был обнаружен полиморфизм по одному локусу.

Процессы утраты генетической изменчивости достаточно подробно изучены на примере тех видов рыб, в отношении которых осуществляются процессы акклиматизации и искусственного воспроизводства [38]. Что касается природных популяций, то таких примеров немного. Показано почти полное отсутствие изменчивости мтДНК гольцов рода *Salvelinus* как следствие действия случайного дрейфа генов в условиях географической изоляции [39–41]. Мы считаем, что основным фактором снижения генетического разнообразия в популяциях *P. perryi* также является случайный дрейф генов. Известно, что интенсивность дрейфа генов обратно пропорциональна величине генетически эффективной численности популяции (N_e); при этом величина N_e всегда значительно меньше общей и репродуктивной численностей [38]. Отметим, что абсолютный мономорфизм ядерных генов описан для таких крупных млекопитающих, как белый медведь [42] и морской слон [43]. По мнению исследователей [44], низкая гетерозиготность у этих видов связана с величиной эффективного размера популяций, который может изменяться в течение длительной эволюции вида под действием целого ряда факторов: локального вымирания отдельных популяций, колебания численности от поколения к поколению, соотношения полов и т.д.

Сахалинский таймень в настоящее время занимает ограниченный ареал, не выходящий далеко за пределы предкового водоема (современного Японского моря), и характеризуется высокой морфоэкологической однородностью [45]. Некоторые особенности биологии *P. perryi* (высокий темп роста, позднее созревание и низкая воспроизводительная способность) поддерживают относительно низкий уровень численности популяций. Одновременно характерный для вида абсолютный хоминг [46] препятствует процессам миграции, которые могли бы в некоторой степени компенсировать действие дрейфа генов. Совокупность этих факторов, вероятно, исторически определила низкий уровень полиморфизма в геноме *P. perryi*. Анализ гетерогенности выборок по частотам гаплотипов методом Монте-Карло [36] выявил статистически значимые различия между парами популяций *P. perryi* р. Киевка и р. Тумнин ($\chi^2 = 8.65$, $d.f. = 2.14$, $P = 0.001$), р. Тумнин и р. Максимовка ($\chi^2 = 4.24$, $d.f. = 2.18$, $P = 0.01$). Учитывая минимальное число нуклеотидных замен между гаплотипами мтДНК *P. perryi* (табл. 2), мы можем рассматривать их как гаплотипы одной предковой популяции. Изменение генетических характеристик под действием случайного дрейфа генов, вероятно, происходит независимо в каждой популяции, с чем и связана обнаруженная гетерогенность.

Генетическая дивергенция

Определены попарные оценки дивергенции нуклеотидных последовательностей между гаплотипами мтДНК [23], рассчитанные для комплекса *Cytb/D-loop*, ND1/ND2, ND3/ND4L/ND4. Сахалинский таймень примерно в одинаковой степени дивергировал от *S. salar* и гольцов рода *Salvelinus* – на 11.0 и 10.0% соответственно. Более высокий уровень дивергенции наблюдается при сравнении гаплотипов *P. perryi* с тайменем и ленками. Дивергенция между *P. perryi* и *H. taimen* составила 14.6%, между *P. perryi* и ленками рода *Brachymystax* – 14.2%, между *H. taimen* и *Brachymystax* – 7.7%. Полученные оценки совпадают с уровнем дивергенции гаплотипов гена *cytb* родов *Parahucho*, *Salvelinus* и *Salmo* (11.0–11.2%) [8], но значительно превышают оценки, полученные на основе RFLP-анализа мтДНК [13].

Достаточно сложно сравнить генетические дистанции между тайменями родов *Parahucho*, *Hucho* и ленками рода *Brachymystax* из-за ограниченности исследованных генов у этих таксонов, поскольку в литературе представлены оценки дивергенции лишь по результатам аллозимного анализа [4], RFLP-анализа мтДНК [13], рибосомной ДНК (rDNA) [10], интрона С гена гормона роста 2 (GH-ПС) [11] и гена *cytb* мтДНК [8]. Тем не менее можно проследить некую общую закономерность, которая выражается в том, что независимо от используемых авторами мер генетических дистанций оценки дивергенции между *Parahucho* и *Hucho*, *Parahucho* и *Brachymystax* приблизительно в 2–2.5 раза превышают таковые между *Hucho* и *Brachymystax*. Эта тенденция сохраняется и при PCR-RFLP-анализе участков *Cytb/D-loop*, ND1/ND2, ND3/ND4L/ND4 митохондриального генома.

Следует также обратить внимание на пару *P. perryi* и *S. leucomaenis*. При расчете попарных расстояний между гаплотипами мтДНК по принципу минимизации мутационных шагов [47] наиболее близкими гаплотипами *P. perryi* оказались гаплотипы *S. leucomaenis* (минимальное расстояние 216 мутационных шагов). По-видимому, учитывая уровень гомоплазий (в среднем 30 для данной пары), преждевременно говорить о генетическом сходстве *P. perryi* и *S. leucomaenis*. Однако согласно результатам RFLP-анализа rDNA наименьший уровень различий в исследуемой группе таксонов разного ранга был выявлен именно между *P. perryi* и *S. leucomaenis* (2.23%), что приблизительно в 1.5–2 раза меньше оценок дивергенции *P. perryi* и двух других видов гольцов (*S. fontinalis* и *S. namaycush*) [10].

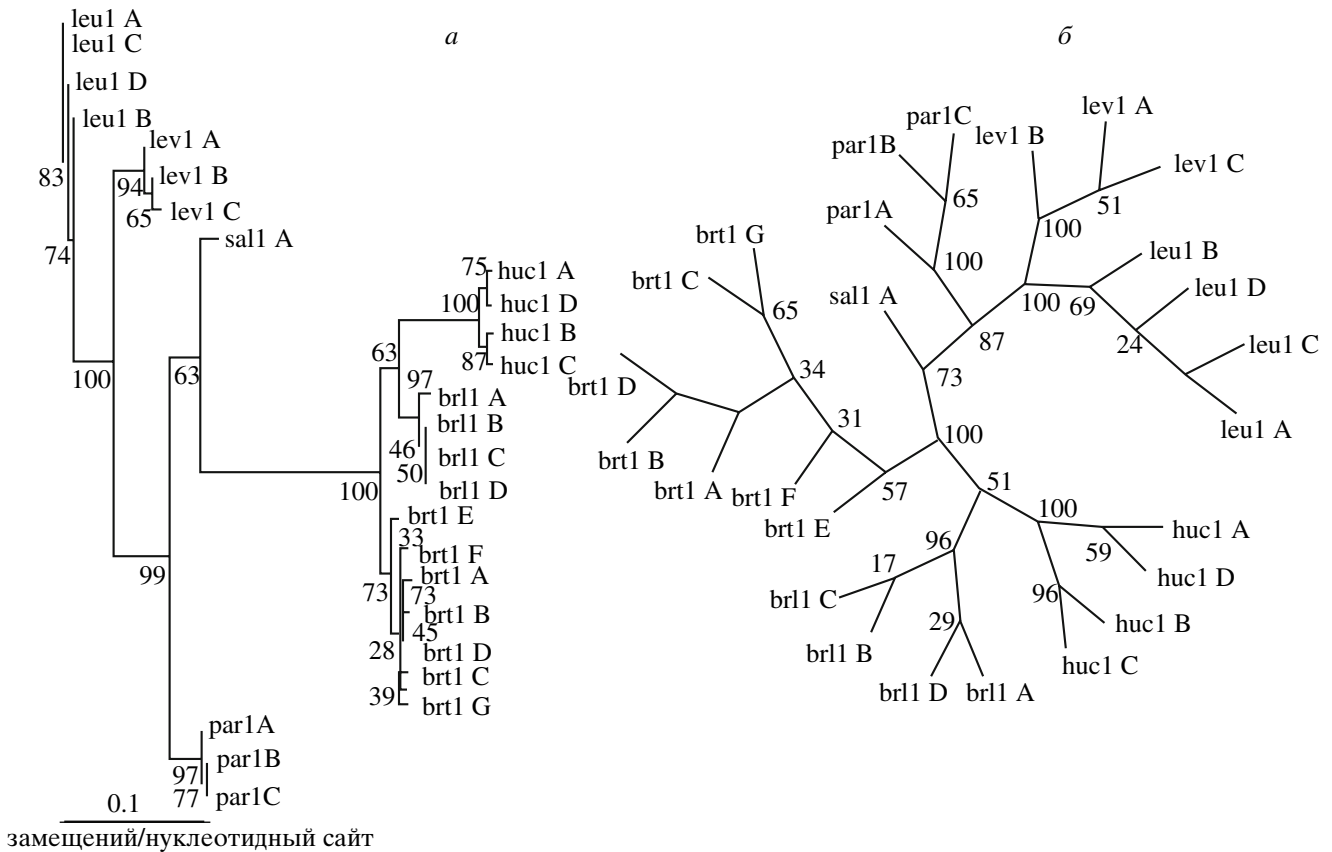


Рис. 1. Сравнение результатов филогенетического анализа гаплотипов мтДНК (фрагмент *Cytb/D-loop*, 180 филогенетически информативных признаков): *a* – NJ-дерево; *б* – MP-дерево. Обозначение гаплотипов: *P. perryi* – par1, *H. taimen* – huc1, *B. lenok* – brl1, *B. tumensis* – brt1, *S. salar* – sal1, *S. leucomaenis* – leu1, *S. levanidovi* – lev1. Цифры – оценки бутстреп-поддержки (% от 1000 реплик).

Филогенетический анализ

Филогенетический анализ был выполнен отдельно для каждого амплифицированного фрагмента и суммарно для мтДНК в целом. При построении дендрограмм (NJ, MP) использовали матрицы генетических дистанций для филогенетически информативных признаков. Так как на данном этапе исследования авторы не ставили перед собой задачу определить последовательность дивергенции таксонов, внешняя группа в анализ не вводилась и все представленные деревья являются бескорневыми. В зависимости от набора признаков были получены филогенетические схемы, которые отличаются последовательностью кластеризации, составом образующихся кластеров и устойчивостью точек ветвления (рис. 1–4).

Фрагмент *Cytb/D-loop*. Матрица для фрагмента *Cytb/D-loop* включает 208 сайтов, 180 из которых определены как филогенетически информативные или общие производные признаки. Согласно топологии NJ-дерева (рис. 1,а), построенного для данного комплекса признаков, гаплотипы *Salvelinus* и *Parahucho* образуют устойчивый кластер (99%), к которому присоединяется гаплотип *Salmo* (63%).

Бутстреп-анализ подтверждает также объединение в один кластер гаплотипов *Hucho* и *Brachymystax* (100%). Однако из-за низких оценок последующего ветвления положение *Hucho*, *B. lenok* и *B. tumensis* следует рассматривать как трихотомию. Самым неустойчивым является положение гаплотипа *Salmo* (63%). Результаты филогенетического анализа методом максимальной экономии с использованием двух моделей расчетов не привели к одному оптимальному дереву. Было оставлено 75 деревьев (длина 292 мутационных шага) при расчетах по алгоритму программы PENNY и 40 деревьев при эвристическом поиске в программе RAUP. Все деревья между собой различались только перестановками ветвей внутри кластеров гаплотипов *Brachymystax*. Топология оптимального дерева (рис. 1,б) представлена согласно программе RAUP, поскольку оно имеет меньшую длину (длина – 273, индексы совместности CI – 0.659, RC – 0.603, индекс удерживания RI – 0.915, индекс гомоплазии HI – 0.341). Различия между 40 деревьями, оцененные с помощью теста Темплетона [30], оказались недостоверными, так как по всем основным характеристикам

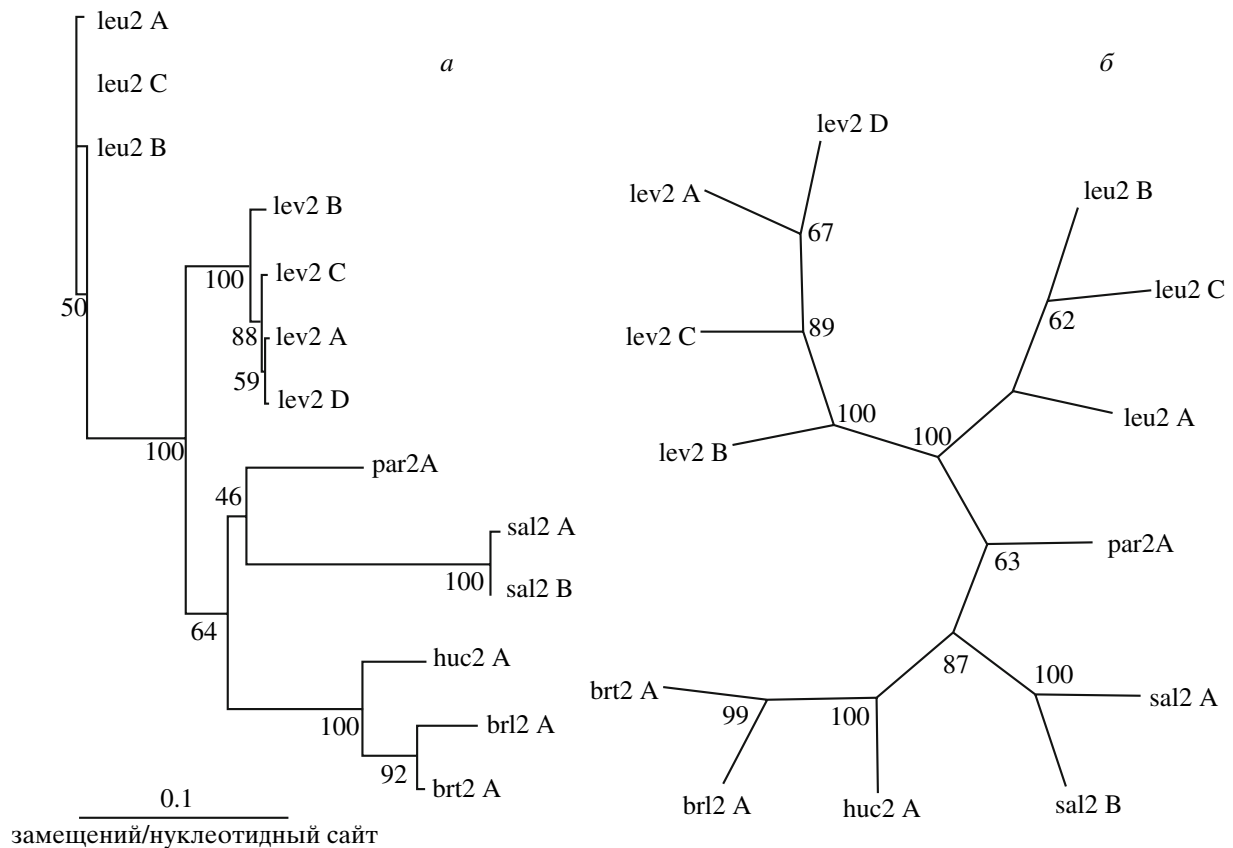


Рис. 2. Сравнение результатов филогенетического анализа гаплотипов мтДНК (фрагмент ND1/ND2, 132 филогенетически информативных признака): а – NJ-дерево; б – МР-дерево. Обозначение гаплотипов: *P. perryi* – par2, *H. taimen* – huc2, *B. lenok* – brl2, *B. tumensis* – brt2, *S. salar* – sal2, *S. leucomaenis* – leu2, *S. levanidovi* – lev2. Цифры – оценки бутстреп-поддержки (% от 1000 реплик).

дерева не отличались от оптимального ($P = 1.00$). Однако топология этого дерева оказалась очень неустойчивой (рис. 1,б). Бутстреп-анализ поддерживает монофилию гаплотипов гольцов *Salvelinus* (100%), *Hucho* и *Brachymystax* (100%). Ветвь *Parahucho* занимает внешнее положение к монофилетической группе *Salvelinus*, ветвь *Salmo* расположена ближе к монофилетической группе *Hucho–Brachymystax*. По сравнению с NJ-деревом значительно понизился уровень бутстреп-оценки ветви *Parahucho* (87%) и немного увеличился для ветви *Salmo* (73%). Таким образом, положение обеих ветвей оказалось неразрешимым из-за низкой поддержки точек ветвления.

Фрагмент ND1/ND2. Матрица для фрагмента ND1/ND2 включает 132 филогенетически информативных признака из 199 сайтов. Согласно топологии NJ-дерева (рис. 2,а), построенного для данного комплекса признаков, гаплотипы образуют три кластера: *S. leucomaenis* и *S. levanidovi*, *Hucho* и *Brachymystax*, *Parahucho* и *Salmo*. Из-за низких оценок бутстреп-анализа положение трех ветвей (*Parahucho*, *Salmo* и общей ветви *Hucho–Brachymystax*) следует рассматривать как трихотомию.

Результаты филогенетического анализа методом максимальной экономии с использованием двух моделей расчетов привели к одному и тому же варианту оптимального дерева (длина – 205 шагов, CI – 0.644, RC – 0.516, RI – 0.804, HI – 0.356). Статистическая оценка неслучайного характера топологии оказалась низкой (рис. 2,б). Показана строгая бутстреп-поддержка (100%) точек ветвления гаплотипов гольцов *Salvelinus*, ленков *Brachymystax* и *Hucho–Brachymystax*. Ветвь *Parahucho* занимает внешнее положение к монофилетической группе *Salvelinus*, ветвь *Salmo* расположена ближе к устойчивой группе *Hucho–Brachymystax*. Тем не менее положение *Parahucho* оказалось неразрешимым из-за низкой поддержки точки ветвления (63%).

Фрагмент ND3/ND4L/ND4. Матрица для фрагмента ND3/ND4L/ND4 включает 124 филогенетически информативных признака из 167 сайтов. Согласно топологии NJ-дерева (рис. 3,а), построенного для данного комплекса признаков, гаплотипы *Salvelinus* и *Salmo* образуют устойчивый кластер (96%). Гаплотип *Hucho* кластеризуется с *Brachymystax* (70%), а *Parahucho* занимает проме-

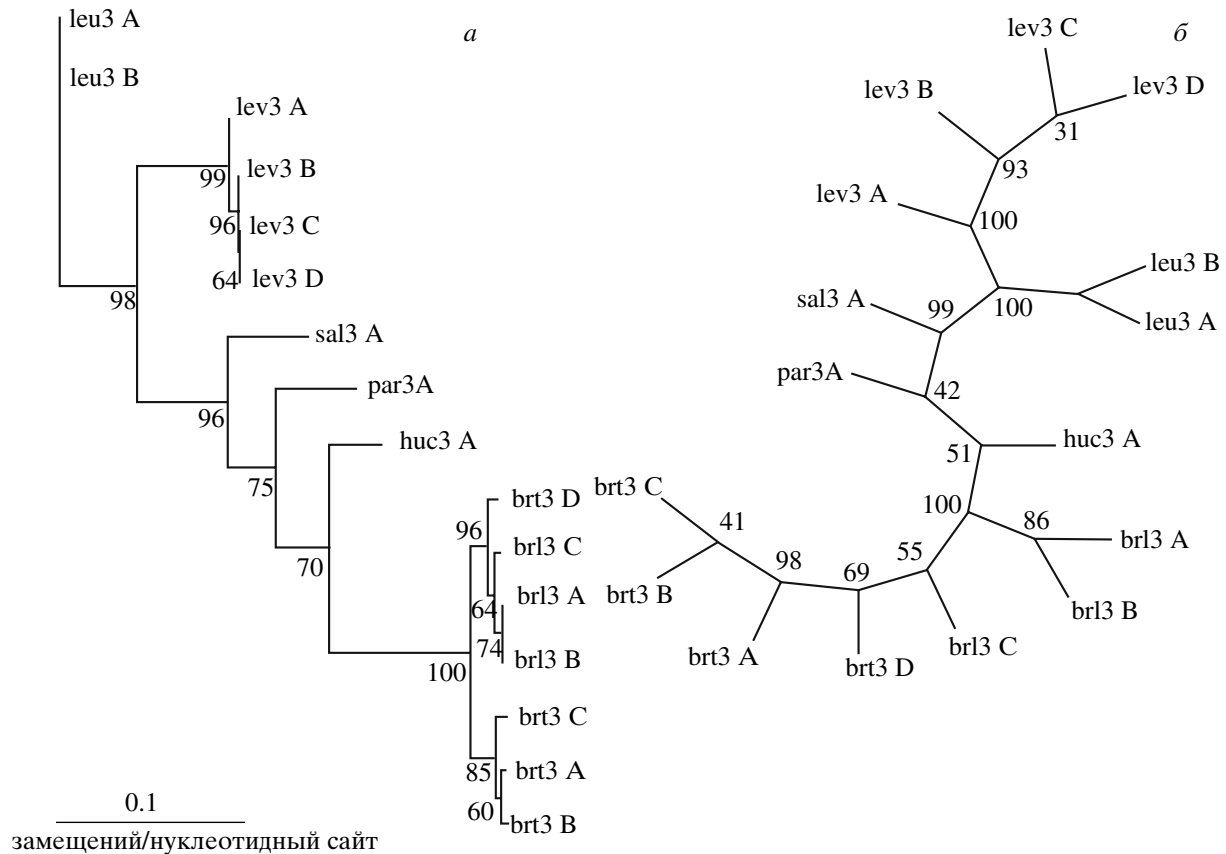


Рис. 3. Сравнение результатов филогенетического анализа гаплотипов мтДНК (фрагмент ND3/ND4L/ND4, 124 филогенетически информативных признака): *a* – NJ-дерево; *б* – MP-дерево. Обозначение гаплотипов: *P. perryi* – par3, *H. taimen* – huc3, *B. lenok* – brl3, *B. tumensis* – brt3, *S. salar* – sal3, *S. leucomaenis* – leu3, *S. levanidovi* – lev3. Цифры – оценки бутстреп-поддержки (% от 1000 реплик).

жуточное положение между ветвями *Hucho* и *Salmo* (75%). Результаты филогенетического анализа методом максимальной экономии с использованием двух моделей расчетов не привели к одному оптимальному дереву. Было оставлено 9 деревьев (длина 241) при расчетах по алгоритму программы PENNY и 4 дерева при эвристическом поиске в программе RAUP. Деревья отличались перестановками ветвей внутри кластеров *S. levanidovi* и *Brachymystax*. Различия между всеми деревьями [30] оказались статистически недостоверными ($P = 1.00$). Топология более экономного MP-дерева (рис. 3,б) представлена согласно программе RAUP (длина – 205 шагов, CI – 0.605, RC – 0.505, RI – 0.834, HI – 0.395) и повторяет топологию NJ-дерева. Согласно предложенной филогенетической гипотезе *Salmo* занимает устойчивое положение (99%) внешней ветви по отношению к монофилетической группе голецов *Salvelinus* (100%). Также подтверждается монофилия ленков *Brachymystax* (100%). *Parahucho* занимает внешнее положение к группе *Hucho-Brachymystax*, однако для точек ветвления *Parahucho* и *Hucho*

оценки бутстреп-анализа оказались ниже, чем для NJ-дерева (рис. 3).

Фрагмент Cytb/D-loop, ND1/ND2, ND3/ND4L/ND4. Суммарный комплекс признаков объединил 574 сайта, 536 из которых были филогенетически информативными. Так как нельзя полностью отвергать гипотезу о постоянной скорости эволюции таксонов, на основе оценок генетических дистанций между гаплотипами мтДНК для комплекса из 574 сайтов была построена фенोगрамма с использованием метода UPGMA (рис. 4,а). NJ-дерево было построено для комплекса 536 филогенетически информативных признаков (рис. 4,б). Тем не менее оба дерева имеют одну топологию, отличающуюся длиной ветвей объединенных кластеров и устойчивостью положения ветвей кластеров гаплотипов *Parahucho* и *Salmo*. Прежде всего следует отметить, что гаплотипы достоверно (100%-ный уровень значимости) группируются соответственно их таксономической принадлежности. С высоким уровнем значимости формируются кластеры *Hucho-Brachymystax* и *S. leucomaenis-S. levanidovi*. Согласно топологии UPGMA-дерева достоверно кластеризуются ветви *Salvelinus-*

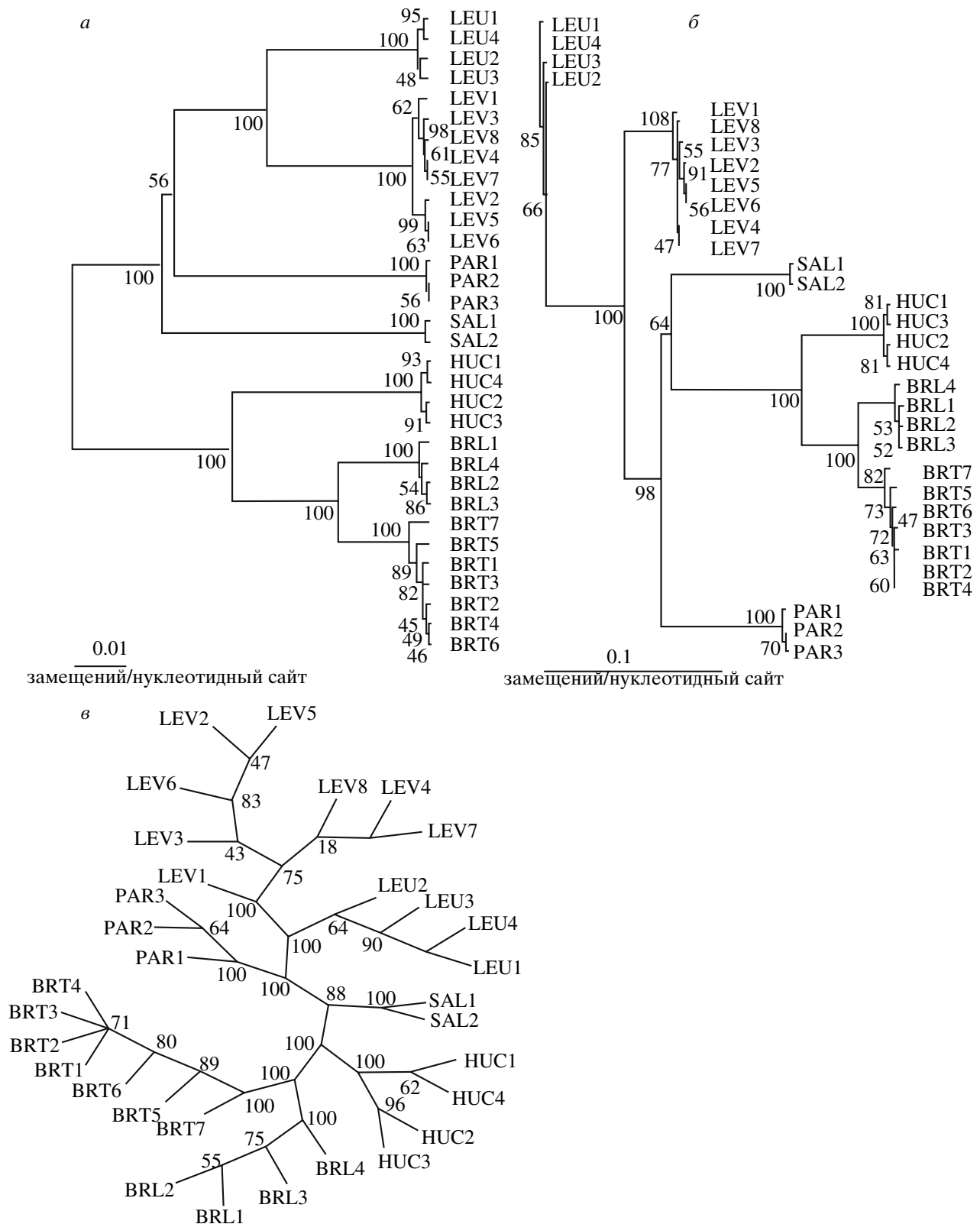


Рис. 4. Сравнение результатов филогенетического анализа гаплотипов мтДНК (фрагмент *Cytb/D-loop*, ND1/ND2, ND3/ND4L/ND4): *а* – UPGMA-дерево, построенное по комплексу из 574 сайтов; *б* – NJ-дерево, построенное по комплексу 536 филогенетически информативных признаков; *в* – MP-дерево, построенное по комплексу 536 филогенетически информативных признаков. Обозначение гаплотипов: *P. perryi* – PAR, *H. taimen* – HUC, *B. lenok* – BRL, *B. tumensis* – BRT, *S. salar* – SAL, *S. leucomaenis* – LEU, *S. levanidovi* – LEV. Цифры – оценки бутстреп-поддержки (% от 1000 реплик).

Parahucho–Salmo (100%), однако внутри этого кластера присоединение *Parahucho* к *Salvelinus* является крайне неустойчивым (56%). Согласно топологии NJ-дерева достоверно объединение в один кластер *Parahucho* и *Salvelinus* (98%), а положение ветви *Salmo* становится неустойчивым (64%). Результаты филогенетического анализа методом максимальной экономии с использованием двух моделей расчетов не привели к одному оптимальному дереву. Было оставлено 75 деревьев (длина 797) при расчетах по алгоритму программы PENNY и 3 дерева при эвристическом поиске в программе RAUP. Все деревья между собой различались только перестановками ветвей внутри кластеров гаплотипов *S. levanidovi* и *Brachymystax*. Топология оптимального МР-дерева (рис. 4,б) представлена согласно программе RAUP, поскольку оно оказалось более экономным (длина – 791, CI – 0.678, RC – 0.633, RI – 0.934, HI – 0.322). Топологические различия между тремя деревьями оказались недостоверными ($P = 1.00$) [30]. Статистическая оценка неслучайного характера топологии оптимального МР-дерева достаточно высокая, так как практически все точки дивергенции таксонов (за исключением ветви *Salmo*) показывают 100%-ную бутстреп-поддержку. Ветвь *Salmo* занимает положение между кластерами *Parahucho–Salvelinus* и *Hucho–Brachymystax* в 88% реплик бутстреп-анализа.

Таким образом, топологии NJ- и МР-деревьев для объединенного по трем фрагментам мтДНК комплекса филогенетически информативных признаков оказались намного устойчивее, чем топология деревьев для индивидуальных фрагментов. К аналогичному выводу пришли ранее и другие исследователи, проводившие анализ филогенетических деревьев индивидуальных генов и объединенных данных для митохондриальных и ядерных генов лососевых рыб сем. Salmonidae [15]. Проблема заключается в недостаточном количестве синапоморфий – общих производных признаков, на которых основан филогенетический анализ. Тем не менее отмечается, что некоторые митохондриальные гены достаточно хорошо определяют родственные связи лососевых рыб. Из всех филограмм, построенных для 16 митохондриальных генов, сахалинский таймень проанализирован только по гену *cytb*. Согласно расчетам байесовских вероятностей, *P. perryi* присоединяется к кластеру *Salvelinus* раньше, чем группа *Hucho–Brachymystax*. На МР-дереве положение ветвей *Parahucho*, *Salvelinus*, *Hucho–Brachymystax* дихотомически не разрешается [15].

Филогенетическая гипотеза, сформулированная по данным RFLP-анализа фрагментов *Cytb/D-loop*, ND1/ND2, ND3/ND4L/ND4 мтДНК, принципиально не отличается от филогенетических схем, полученных в результате RFLP-анализа гДНА [10] и секвенирования последовательностей ин-

трона С генов гормона роста *GH-I* и *GH-II* [7.11]. Не вызывает сомнения валидность рода *Parahucho* и его значительная дивергенция от близкородственных между собой таксонов *Hucho* и *Brachymystax*. Для объяснения трихотомии ветвей *Parahucho*, *Salvelinus*, *Salmo* была сформулирована гипотеза, согласно которой дивергенция этих родов от общего предка происходила очень быстро. Следствием этого является небольшое число синапоморфий, определяющих родственные взаимоотношения и последовательность дивергенции [7].

В заключение отметим, что авторы не склонны рассматривать полученную филогенетическую схему как окончательную в отношении положения *P. perryi*. Введение в анализ внешней группы позволит установить направление эволюционных изменений и провести филетическое взвешивание признаков в отношении предкового состояния. Анализ остальных митохондриальных генов может сделать положение ветви *Parahucho* более устойчивым. Очевидно, что информация, заключенная в различных генах мтДНК, является взаимодополняющей, если ставится задача филогенетического анализа таксонов. В этом случае репрезентативная выборка сайтов из разных участков генома лучше представляет изменчивость генома в целом, чем смежные сайты секвенированных последовательностей одного гена [12, 48, 49].

Авторы глубоко признательны С.В. Фролову, Е.В. Иванковой, С.Д. Олейник, В.Т. Омельченко (Институт биологии моря ДВО РАН) за помощь в сборе материала, а также выражают благодарность Т.В. Малининой (Институт общей генетики РАН) за любезно предоставленные препараты *Salmo salar*.

Исследование осуществлено при финансовой поддержке Программы Президиума РАН (проекты 06-I-П10-015, 06-I-П11-025), а также Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 01-04-49436).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Викторовский Р.М., Макоедов А.Н., Шевчишин А.А. Хромосомные наборы ленка и сибирского тайменя и дивергенция родов лососевых // Цитология. 1985. Т. 27. № 6. С. 703–709.
2. Holcik J., Hensel K., Nieslanik J., Skacel L. The Eurasian huchen, *Hucho hucho*: Largest salmon of the World. Dordrecht, Netherlands: Junk Publ., 1988. 239 p.
3. Дорофеева Е.А. Основные принципы классификации и филогении лососевых рыб (Salmoniformes, Salmonoidei, Salmonidae) // Биология и филогения рыб. Л.: ЗИН АН СССР, 1989. С. 5–15.
4. Осинев А.Г. Генетическая дивергенция и филогенетические взаимоотношения ленков рода *Brachy-*

- mystax* и тайменей родов *Hucho* и *Parahucho* // Генетика. 1991. Т. 27. № 12. С. 2127–2136.
5. Stearley R.Y., Smith G.R. Phylogeny of the Pacific trout and salmon (*Oncorhynchus*) and genera of the family Salmonidae // Trans. Am. Fish. Soc. 1993. V. 122. № 1. P. 1–33.
 6. Глубоковский М. К. Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука, 1995. 343 с.
 7. Oakley T.H., Phillips R.B. Phylogeny of salmonine fishes based on growth hormone introns: Atlantic (*Salmo*) and Pacific (*Oncorhynchus*) salmon are not sister taxa // Mol. Phylogenetics and Evolution. 1999. V. 11. № 3. P. 381–393.
 8. Шедько С.В. Филогения митохондриальной ДНК лососевых рыб подсемейства Salmoninae: анализ последовательностей гена цитохрома *b* // Генетика. 2002. Т. 38. № 3. С. 357–367. (Shed'ko S.V. Phylogeny of mitochondrial DNA in salmonids of the subfamily Salmoninae: Analysis of the cytochrome *b* gene sequences // Rus. J. Genetics. 2002. V. 38. № 3. P. 277–285.)
 9. Vladykov V.D., Gruchy C.D. Comments on the nomenclature of some subgenera of Salmonidae // J. Fish. Res. Board Can. 1972. V. 29. P. 1631–1632.
 10. Phillips R.B., Oakley T.H., Davis E.L. Evidence supporting the paraphyly of *Hucho* (Salmonidae) based on ribosomal DNA restriction maps // J. Fish Biol. 1995. V. 47. P. 956–961.
 11. Phillips R.B., Oakley T.H. Phylogenetic relationships among the Salmoninae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences // Molecular Systematic of Fishes. San Diego: Acad. Press, 1997. P. 145–162.
 12. Олейник А.Г., Полякова Н.Е. Рестриктазный анализ митохондриального генома лососевых рыб семейства Salmonidae // Генетика. 1994. Т. 30. № 9. С. 1202–1214. (Oleinik A.G., Polyakova N.E. Restriction analysis of the mitochondrial genome in the family Salmonidae // Rus. J. Genetics. 1994. V. 30. № 9. P. 1043–1054.)
 13. Shed'ko S.V., Ginatulina L.K., Parpura I.Z., Ermolenko A.V. Evolutionary and taxonomic relationships among Far-Eastern salmonids fishes inferred from mitochondrial DNA divergence // J. Fish Biol. 1996. V. 49. P. 815–829.
 14. Froufe E., Alekseyev S., Knizhin I., Weiss S. Comparative mtDNA sequence (control region, ATPase 6 and NADH1) divergence in *Hucho taimen* (Pallas) across four Siberian river basins // J. Fish Biol. 2005. V. 67. № 4. P. 1040–1053.
 15. Crespi B.J., Fulton M.J. Molecular systematics of Salmonidae: Combined nuclear data yields a robust phylogeny // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2004. V. 31. P. 658–679.
 16. Олейник А.Г., Полякова Н.Е. Анализ межвидовой генетической дифференциации у некоторых видов сем. Salmonidae // Деп. ВИНТИ. 16.04.92. № 1317–1392. 1992. 42 с.
 17. Froufe E., Sefc K.M., Alexandrino P., Weiss S. Isolation and characterization of *Brachymystax lenok* microsatellite loci and cross-species amplification in *Hucho* spp. and *Parahucho perryi* // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. № 2. P. 150–152.
 18. Бозуцкая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М.: Тов-во научных изданий КМК, 2004. 389 с.
 19. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
 20. Gharrett A.J., Gray A.K., Brykov V.A. Mitochondrial DNA variation in Alaskan coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* // Fish. Bull. 2001. V. 99. P. 528–544.
 21. Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Brykov V.A. Divergence of the *Salvelinus* species mitochondrial DNA from northeastern Asia // Ecology Freshwater Fish. 2007. V. 16. № 1. P. 87–98.
 22. McElroy D., Moran P., Bermingham E., Kornfield I. REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data // J. Heredity. 1992. V. 83. P. 153–158.
 23. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5269–5273.
 24. Nei M., Tajima F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases // Genetics. 1981. V. 97. P. 145–163.
 25. Sneath P.H.A., Sokal R.R. Numerical Taxonomy. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.
 26. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425.
 27. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
 28. Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.67. Univ. Washington, 2007.
 29. Swofford D.L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.
 30. Templeton A. R. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes // Evolution. 1983. V. 37. P. 221–244.
 31. Hendy M. D., Penny D. Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees // Mathematical Biosciences. 1982. V. 59. P. 277–290.
 32. Schneider S., Roessli D., Excoffier L. Arlequin, version 2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Switzerland: Univ. Geneva, 2000.
 33. Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations // Genetics. 1983. V. 105. P. 437–460.
 34. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 3321–3323.
 35. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. N. Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
 36. Roff D., Bentzen P. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: chi-square and the problem of small samples // Mol. Biol. Evol. 1989. V. 5. P. 539–545.

37. Yamamoto S., Morita K., Kitano S. et al. Phylogeography of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) inferred from mitochondrial DNA sequences // Zool. Sci. 2004. V. 21. P. 229–240.
38. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2003. 431 с.
39. Brunner P.C., Douglas M.R., Bernatchez L. Microsatellite and mitochondrial DNA assessment of population structure and stocking effects in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (Teleostei: Salmonidae) from central Alpine lakes // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 209–223.
40. Hartley S.E., Bartlett S.E., Davidson W.S. Mitochondrial DNA analysis of Scottish populations of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) // J. Fish Biol. 1992. V. 40. P. 219–224.
41. Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Чукова Е.И. Влияние изоляции на генетические характеристики популяций гольцов рода *Salvelinus* // Генетика. 2007. Т. 43. № 9. С. 1209–1217. (Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Chukova E.I. Effect of isolation on the genetics characteristics of populations in charrs of the genus *Salvelinus* // Rus. J. Genetics. 2007. V. 43. № 9. P. 1006–1013.)
42. Allendorf F.W., Christiansen F.B., Dobson T. et al. Electrophoretic variation in large mammals. I. The polar bear, *Thalarctos maritimus* // Hereditas. 1979. V. 91. P. 19–22.
43. Bonnell M.L., Selander R.K. Elephant seals: Genetic variation and near extinction // Science. 1974. V. 184. P. 908–909.
44. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М.: Мир, 1985. 398 с.
45. Гриценко О.Ф., Чуриков А.А. Исследования экологии тайменя *Hucho perryi* (Brevoort) Северного Сахалина. М.: ОНТИ ВНИРО, 1977. 26 с.
46. Парпура И.Э. Биология сахалинского тайменя *Parahucho perryi* и гольцов рода *Salvelinus* в водах северного Приморья: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: ТИНРО, 1991. 23 с.
47. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. 1992. V. 131. P. 479–491.
48. Churikov D., Matsuoka M., Luan X. et al. Assessment of concordance among genealogical reconstruction's from various mtDNA segments in three species of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 2329–2339.
49. Cummings M.P., Otto S.P., Wakeley J. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis // Mol. Biol. Evol. 1995. V. 12. P. 814–822.

Phylogenetic Relationships of Sakhalin Taimen *Parahucho perryi* Inferred from PCR–RFLP Analysis of Mitochondrial DNA

A. G. Oleinik and L. A. Skurikhina

Zhirmunskii Institute of Marine Biology, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia;
e-mail: alla_oleinik@mail.ru

Abstract—RFLP analysis of three amplified mtDNA fragments (Cytb/D-loop, ND1/ND2, and ND3/ND4L/ND4) was performed in the following taxa: *Parahucho perryi*, *Hucho taimen*, *Brachymystax lenok*, *B. tumensis*, *Salmo salar*, *Salvelinus leucomaenis*, and *S. levanidovi*. For mtDNA of *P. perryi*, a substantial decrease in the haplotype and nucleotide diversity was observed as a result of random genetic drift, caused by a reduction in the effective population size. Nucleotide divergence estimates between the mtDNA haplotypes were determined. Sakhalin taimen *P. perryi* was found to be approximately equally diverged from *S. salar* and from the charrs of the genus *Salvelinus*, by 11.0 and 10.0%, respectively. The divergence between *P. perryi* and *H. taimen* constituted 14.6%, between *P. perryi* and lenoks of the genus *Brachymystax*, 14.2%, and between *H. taimen* and *Brachymystax*, 7.7%. The analysis of possible phylogenetic relationships of the mtDNA from *P. perryi* among the group of taxa examined confirmed validity of the genus *Parahucho*. Phylogenetic reconstructions performed showed that robustness of the trees constructed for the complex of phylogenetically informative characters over three mtDNA fragments was considerably higher than that of the trees constructed for individual genes.