

На правах рукописи

Бондарь Евгения Игоревна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПРИРОДНЫХ ИЗОЛИРОВАННЫХ
ПОПУЛЯЦИЯХ ГОЛЬЦОВ РОДА *SALVELINUS***

03.02.07 – генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2010

Работа выполнена в Лаборатории генетики Учреждения Российской академии наук
Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Брыков Владимир Алексеевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Крюков Алексей Петрович

кандидат биологических наук

Катугин Олег Николаевич

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Защита состоится 27 декабря 2010 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета
Д005.008.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В.
Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон:
(4232) 310–905, факс: (4232) 310–900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук
Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул.
Пальчевского, 17).

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

Автореферат разослан ноября 2010 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук



М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Генетическая изменчивость является одним из важнейших факторов, определяющих скорость и направление эволюции видов и популяций. Уровень генетического разнообразия определяется естественным отбором, мутациями, миграциями и случайным дрейфом генов. В большей степени стохастические процессы выражены в популяциях с небольшой численностью, а также в изолированных популяциях, сформировавшихся как в силу естественных причин (при возникновении физических преград и заселении новых регионов), так и в результате антропогенного воздействия (акклиматизации или инвазии).

При формировании новых популяций и видов, в ходе аллопатрического видообразования, происходит смещение распределения частот аллелей, и данный процесс принято считать “эффектом основателя” (Майр, 1968). Смещение распределения частот аллелей наблюдается и при резком снижении численности популяции, вызванной изменениями условий обитания как природного (изменение климатических условий), так искусственного (чрезмерный промысел, строительство дамб) характера. В случае изменения популяционной численности и связанного с ней снижения генетического разнообразия принято говорить о прохождении популяции через “горлышко бутылки”.

В последние десятилетия, в связи с усилившимся антропогенным воздействием, стало особенно важным вовремя выявить популяции, подвергшиеся действию дрейфа генов, и предотвратить дальнейшее снижение генетического разнообразия. Поэтому весьма актуальным становится изучение процессов, происходящих в природных изолированных системах, что позволит разработать систему мониторинга генетических изменений, вызванных прохождением популяции через “горлышко бутылки”, которое, в свою очередь, может привести к быстрой потере генетической изменчивости, фиксации негативных аллелей, а также к инбредной депрессии.

Проследить влияние дрейфа генов в истории развития популяций легче с помощью анализа наиболее быстро эволюционирующих генетических маркеров: митохондриальной ДНК (мтДНК) и микросателлитных локусов ядерной ДНК. В связи с тем, что эти маркеры наследуются независимо, обладают разной скоростью эволюции и чувствительностью к прохождению популяцией через фазу низкой численности, совместный анализ мтДНК и микросателлитных локусов может достоверно описать картину популяционных изменений в результате действия дрейфа генов.

Влияние дрейфа генов на популяции было изучено на многих видах (обзоры: Салменкова, 2008; Dlugosch, Parker, 2008), но большинство работ проведены или для отдельного случая популяционной изоляции, или с использованием одного маркера. В настоящей работе для описания влияния изоляции на генетические характеристики популяций был изучен ряд популяций гольцов рода *Salvelinus*, обладающих высокой экологической пластичностью, позволяющей

им осваивать самые разнообразные биотопы, что делает их превосходным модельным объектом. Для получения полной картины генетической изменчивости был проведен анализ как митохондриального, так и ядерного геномов.

Цели и задачи исследования. Цель данной работы состояла в изучении генетических процессов, происходящих в природных изолированных популяциях гольцов рода *Salvelinus*. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Оценить молекулярное разнообразие в изолированных и контрольных популяциях *Salvelinus malma malma* и *Salvelinus malma krascheninnikovi* на основе анализа рестрикционного полиморфизма трех участков митохондриальной ДНК и 10 микросателлитных локусов ядерной ДНК.
2. Провести генеалогический анализ гаплотипов митохондриальной ДНК для реконструкции демографической истории изолированных популяций.
3. Дать оценку вероятности прохождения изолированными популяциями через стадию низкой численности, сравнить результаты тестирования для разных статистических моделей.
4. Проанализировать исторические причины формирования современной генетической структуры изолированных популяций гольцов.
5. Оценить возможность использования митохондриальной ДНК и микросателлитных локусов для выявления случайного дрейфа генов в природных популяциях.

Научная новизна. Впервые проведен сравнительный анализ изменчивости мтДНК и микросателлитных локусов в изолированных и контрольных популяциях *S. malma malma* и *S. malma krascheninnikovi*. Проанализированы исторические причины формирования современной генетической структуры изолированных популяций. С использованием разных статистических моделей проведена оценка вероятности прохождения популяциями через “горлышко бутылки”. Дана оценка возможности использования митохондриальной ДНК и микросателлитных локусов для выявления случайного дрейфа генов в природных популяциях.

Теоретическая и практическая значимость. Анализ генетической изменчивости *S. malma malma* и *S. malma krascheninnikovi* важен для понимания процессов, происходящих в изолированных популяциях, подверженных влиянию случайного генетического дрейфа. Полученные данные могут быть использованы для мониторинга состояния искусственно воспроизводимых популяций и природных изолированных систем.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: Конференция студентов, аспирантов и молодых ученых НОЦ ДВГУ “Морская биота” (Владивосток, 2006); X Международная молодежная конференция по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2006); Международная конференция “Modern Achievements in Population, Evolutionary and Ecological

Genetics” (МАРЕЕГ) (Владивосток, 2007); Международная конференция “Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб” (Санкт-Петербург, 2008); 6th International chart symposium (Стирлинг, Великобритания, 2009); V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина (Москва, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них – 3 статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК.

Объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 154 наименования, в том числе 114 на иностранных языках. Работа изложена на 166 страницах, содержит 30 таблиц и 12 рисунков.

Личный вклад. Автор провел PCR-RFLP анализ 9 популяций гольцов рода *Salvelinus* с использованием 13 рестрикционных ферментов. На базе Института общей генетики им. Н.И. Вавилова (г. Москва) проведен анализ изменчивости 10 микросателлитных локусов 12 популяций гольцов рода *Salvelinus*. Автор обработал полученные данные с использованием различных статистических программ.

Благодарности. Автор искренне благодарит своих научных руководителей Аллу Геннадьевну Олейник и Владимира Алексеевича Брыкова за всестороннюю помощь и поддержку. Автор выражает глубокую признательность за помощь в сборе материала С.В. Фролову, И.Н. Рязановой, В.А. Паренскому, за помощь в анализе микросателлитных локусов – Д.В. Политову и Н.В. Гордеевой, а также Скурихиной Л.А.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В первой части обзора литературы описаны основные характерные особенности использованных генетических маркеров (митохондриальной ДНК и микросателлитных локусов ядерной ДНК). Вторая часть посвящена описанию стохастических процессов в природных популяциях на основании литературных данных. В заключительной части приводится краткое описание биологии модельного объекта *S. malma* (Walbaum), а также степень изученности двух подвидов, *S. malma krascheninnikovi* и *S. malma malma*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика выборок. В ходе работы были проанализированы популяции северной азиатской мальмы *Salvelinus malma malma* и южной азиатской мальмы *S. malma krascheninnikovi*, представляющие разные модельные экосистемы (табл. 1).

Популяция из оз. Крокур была интродуцирована примерно 25 лет назад из р. Кроноцкой, поэтому представляет собой искусственный изолят. Популяции ручья (руч.) Безымянного (изолированного от моря непроходимым для рыбы водопадом) и р. Лесной (изолированной теплым серным ручьем) являются природными географическими изолятами. В ручьях Шамора и Смольный обитают жилые популяции гольцов. Популяции р. Седанка и ручья Лагерного представляют собой искусственные изоляты, полученные в результате фрагментации естественной среды обитания, время образования которых нам известно. Популяция ключа (кл.) Холодного представлена самовоспроизводящейся популяцией карликовых гольцов. Так как проходные гольцы в ручье обнаружены не были, можно считать, что в настоящее время обмена генами с другими локальными популяциями не происходит.

В качестве контроля были проанализированы выборки проходной *S. malma malma* из р. Кроноцкая, р. Ола и руч. Кулькуты и проходной *S. malma krascheninnikovi* из руч. Анива, р. Вал и р. Акур.

Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделяли по стандартной методике из ткани печени, взятой у свежевывловленной рыбы и зафиксированной в этиловом спирте (Sambrook et al., 1989).

Таблица 1. Данные об исследованных популяциях гольцов рода *Salvelinus*

Вид	Популяция	Географическое положение	Форма	Количество проанализированных образцов	
				PCR-RFLP	Микросателлитные локусы
<i>S. malma malma</i>	Оз. Крокур	П-ов Камчатка	Интродуцирована	35	35
	Р. Кроноцкая	П-ов Камчатка	Проходная	32	12
	Кл. Холодный	Бассейн Охотского моря	Ручьевая	24	24
	Руч. Лагерный	Бассейн Охотского моря	Изолят	13	25
	Р. Ола	Бассейн Охотского моря	Проходная	24	26
	Руч. Кулькуты	Бассейн Охотского моря	Проходная	28	31
<i>S. malma krascheninnikovi</i>	Руч. Безымянный	О. Сахалин	Изолят	24	24
	Руч. Анива	О. Сахалин	Ручьевая/проходная	26	31
	Р. Лесная	О. Кунашир	Изолят	30	30
	Р. Вал	О. Сахалин	Проходная	19	–
	Р. Шамора	Бассейн Японского моря	Ручьевая	33	32
	Р. Седанка	Бассейн Японского моря	Ручьевая/изолят	31	31
	Р. Акур	Бассейн Японского моря	Проходная	24	20
	Руч. Смольный	Бассейн Японского моря	Ручьевая	29	–

PCR-RFLP анализ митохондриальной ДНК. Фрагменты митохондриальной ДНК амплифицировали на тотальной геномной ДНК с использованием праймерных последовательностей, разработанных для лососей *Oncorhynchus mykiss* и *Oncorhynchus kisutch* (Gharrett et al., 2001). Амплифицированные фрагменты были проанализированы

набором из тринадцати рестрикционных ферментов в условиях, рекомендованных изготовителем (“МБИ Ферментас” Lithuania, “СибЭнзим”, Россия): *Bst*UI, *Dde*I, *Eco*RV, *Rsa*I, *Msp*I, *Cfr*13I, *Hinf*I, *Hha*I, *Ava*II, *Bst*NI, *Mbo*I, *Ava*I, *Sty*I. Продукты рестрикции разделяли в 1.5–2% агарозном геле, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. В качестве молекулярных маркеров длины использовали фрагменты ДНК фага λ и плазмиды pUC19, гидролизованные рестриктазами *Pst*I и *Msp*I соответственно.

Статистический анализ мтДНК. Варианты расщепления по каждому фрагменту и по каждому ферменту обозначались буквой. Результаты анализа мтДНК каждой особи по всем сайтам и всем ферментам объединяли, получая, таким образом, комбинированные гаплотипы, в дальнейшем – гаплотипы. Гаплотипы северной азиатской мальмы *S. malma malma* обозначались буквой N, а гаплотипы южной азиатской мальмы *S. malma krascheninnikovi* буквой S.

Статистические расчеты выполняли с применением пакетов программ REAP (McElroy et al., 1992), PHYLIP 3.69 (Felsenstein, 2004) и ARLEQUIN версия 3.11 (Schneider et al., 2000). Для расчета статистической значимости различий между популяциями был использован метод Монте-Карло, реализованный в программе MONTE (REAP). Критерий F_{ST} , как показатель меры генетической дифференциации рассчитывался в программе ARLEQUIN (версия 3.11). Также в программе ARLEQUIN (версия 3.11) были проведены тесты нейтральности мтДНК Таджимы (Tajima, 1989) и Фу (Fu, 1997). Для реконструкции филогенетических связей между гаплотипами мтДНК было построено MST-дерево в программе NETWORK 4.5.02 (“Fluxus Technology Ltd”., www.fluxus-engineering.com).

Анализ микросателлитных локусов ядерной ДНК. В работе использовано десять микросателлитных локусов, из которых Smm-3, Smm-5, Smm-17, Smm-21 (Crane et al., 2004), Omy301 (Estoup et al., 1993), SSOSL456 (Slettan et al., 1997) включают динуклеотидные повторы; Smm-10, Smm-24 (Crane et al., 2004), Ogo1a (Olsen et al., 1998), Ssa197 (O’Reilly et al., 1996) – тетрануклеотидные повторы. Электрофоретическое разделение аллелей проводили в течение 2–2.5 ч при 300V в 6% денатурирующем полиакриламидном геле, гель окрашивали раствором бромистого этидия. В качестве маркеров стандартных длин фрагментов использовали ДНК плазмиды pBR322, обработанной рестриктазой *Hae*III.

Статистический анализ микросателлитных локусов. Генетическую изменчивость в выборках оценивали с помощью показателя аллельного разнообразия (A), аллельного разнообразия, скорректированного по минимальному размеру выборки (A_r), наблюдаемой (H_o) и ожидаемой гетерозиготности (H_e), которые рассчитывали с помощью программы FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Тесты на соответствие генотипических частот равновесию

Харди-Вайнберга в каждом локусе и каждой выборке, а также проверку на неравновесие по сцеплению для всех пар локусов выполняли в программе GENEPOP 4.0 (Raymond, Rousset, 1995). Уровень статистической значимости для множественных вероятностных тестов корректировали с помощью последовательной процедуры Бонферрони (Rice, 1989).

Расчет индекса фиксации F_{st} (Weir, Cockerham, 1984), F_{st} дистанций (Reynolds et al., 1984; Slatkin, 1995) и индекса R_{st} (Slatkin, 1995) между всеми парами выборок проводили с помощью программы ARLEQUIN 3.11. С помощью программы MSA 4.05 (Dieringer, Schlotterer, 2003) были рассчитаны $(\delta\mu)^2$ дистанции (Goldstein et al., 1995) и хорд-дистанции Кавалли-Сфорца (D_{CE}) (Nei, Kumar, 2000), а также бутстреп-матрицы этих дистанций (по 1000 псевдореплик), на основании которых в PHYLIP 3.69 (Felsenstein, 2004) были построены NJ-деревья. Узлы с бутстреп-поддержкой более 50% считались достоверными.

Были использованы три различных метода тестирования популяций на прохождение через “горлышко бутылки”. Были применены 3 теста из программы BOTTLENECK 1.2.02 (Piry et al., 1997), которые основаны на сравнении гетерозиготности наблюдаемой (H_o) с теоретически ожидаемой (H_e), рассчитываемой исходя из предположения равновесия дрейф-мутации на основании выявленного в выборке числа аллелей. Были использованы три различные модели: бесконечного числа аллелей (IAM), пошаговая мутационная (SMM) и двухфазная модель (TPM). Модель бесконечного числа аллелей (IAM) подразумевает, что каждая новая мутация создает новый аллель, при этом пошаговая мутационная модель (SMM) предполагает увеличение или уменьшение числа повторов. В связи с тем, что определенная часть мутаций не пошаговые, а состоят из большего числа изменений, была предложена двухфазная модель. Предполагается, что в TPM, по умолчанию, 70% мутаций приходится на пошаговые и 30% – на большие мутации, таким образом, двухфазная модель является промежуточной и содержит 30% IAM и 70% SMM.

Также был рассчитан индекс M , который позволяет выявлять недавнее прохождение популяцией через генетическое “горлышко бутылки”, а также дает теоретическую возможность определить “горлышко бутылки” за более длительный промежуток времени по сравнению с другими подходами. Эмпирические данные свидетельствуют о том, что значения ниже 0.7 говорят о прохождении популяции через фазу низкой численности.

Третий подход к определению прохождения популяции через “горлышко бутылки” подразумевает, что в популяциях, не прошедших фазу низкой численности и находящихся в равновесии, по селективно нейтральным локусам будет наблюдаться больше низкочастотных аллелей. При прохождении же через “горлышко бутылки” популяция будет быстрее терять низкочастотные аллели, что приведет к нарушению L-образного распределения (Luikart,

1998). Смещение распределения частот аллелей было рассчитано с использованием программы BOTTLENECK 1.2.02.

РЕЗУЛЬТАТЫ

PCR-RFLP анализ мтДНК гольцов рода *Salvelinus*. Были амплифицированы три участка мтДНК (D-loop/cytb, ND5/ND6, ND1/ND2) с общей длиной 7972 пар нуклеотидов, которые в сумме составляют около 47% от митохондриального генома лососей.

Общее описание гетерогенности популяций. У 372 исследованных особей было выявлено 46 комбинированных гаплотипов мтДНК: 15 в популяциях *S. malma malma* и 31 у *S. malma krascheninnikovi*. Значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия в популяциях *S. malma malma* варьируют от 0.0571 ± 0.0532 до 0.7862 ± 0.0446 и от 0.000195 до 0.004377 соответственно, а в популяциях *S. malma krascheninnikovi* – от 0.0000 ± 0.0000 до 0.9415 ± 0.0351 и от 0.000000 до 0.004632 (табл. 2).

Таблица 2. Основные показатели изменчивости мтДНК в популяциях гольцов рода *Salvelinus*

Вид	Популяция	Молекулярное разнообразие*			Гаплотипическое разнообразие (h)	Нуклеотидное разнообразие (π)
		1	2	3		
<i>S. malma malma</i>	Оз. Крокур	35	2	9	0.0571 ± 0.0532	0.000374
	Р. Кроноцкая	32	9	31	0.7621 ± 0.0553	0.004377
	Кл. Холодный	24	6	16	0.7862 ± 0.0446	0.001911
	Руч. Лагерный	13	2	2	0.3846 ± 0.1321	0.000545
	Р. Ола	24	3	3	0.2355 ± 0.1093	0.000286
	Руч. Кулькуты	28	2	2	0.1376 ± 0.0837	0.000195
	Среднее				0.3939 ± 0.0797	0.001281
<i>S. malma krascheninnikovi</i>	Руч. Безымянный	24	1	0	0.0000 ± 0.0000	0.000000
	Руч. Анива	26	11	21	0.6738 ± 0.1044	0.002742
	Р. Лесная	30	3	6	0.1310 ± 0.0821	0.000433
	Р. Вал	19	12	18	0.9415 ± 0.0351	0.004632
	Р. Шамора	33	2	1	0.0606 ± 0.0561	0.000041
	Р. Седанка	31	3	3	0.4108 ± 0.0873	0.000329
	Р. Акур	24	7	12	0.8080 ± 0.0557	0.002188
	Руч. Смольный	29	2	3	0.1921 ± 0.0902	0.000383
Среднее				0.4022 ± 0.0639	0.001343	

*Показатели молекулярного разнообразия: 1 – объем выборки, 2 – число гаплотипов, 3 – число полиморфных сайтов.

Тестирование географической подразделенности полиморфизма мтДНК методом Монте-Карло (McElroy et al., 1992) и методом одноуровневой AMOVA (Excoffier et al., 1992) выявили статистически значимые различия между всеми парами исследованных популяций ($P < 0.05 - 0.001$) (табл. 3 и 4). Исключение составили пары Ола–Кулькуты, Ола–Лагерный и Лагерный–Кулькуты, для которых критерий χ^2 и F_{st} оказались недостоверными.

Таблица 3. Значения χ^2 (выше диагонали) и F_{st} (ниже диагонали) между популяциями *S. malma malma* по данным анализа мтДНК

Популяции	Крокур	Кроноцкая	Холодный	Лагерный	Ола	Кулькuty
Крокур	–	29.31***	32.16***	34.04***	51.17***	55.35***
Кроноцкая	0.1274***	–	32.28***	33.13***	48.92***	53.04***
Холодный	0.1743***	0.1169***	–	10.97*	22.93***	25.95***
Лагерный	0.6664***	0.2591***	0.1582**	–	2.01	2.11
Ола	0.7811***	0.3819***	0.3280***	0.0257	–	1.23
Кулькuty	0.8079***	0.4083***	0.3643***	0.0589	-0.0337	–

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Таблица 4. Значения χ^2 (выше диагонали) и F_{st} (ниже диагонали) между популяциями *S. malma krascheninnikovi* по данным анализа мтДНК

Популяции	Безымянный	Лесная	Анива	Вал	Шамора	Седанка	Акур	Смольный
Безымянный	–	54.00***	13.02*	35.51***	57.00***	55.00***	48.00***	53.00***
Лесная	0.8809***	–	56.00***	49.00***	63.00***	61.00***	54.00***	59.00***
Анива	0.1385***	0.4757***	–	32.30**	55.07***	53.47***	46.66***	51.99***
Вал	0.4658***	0.4637***	0.1865*	–	52.00***	50.00***	43.00***	48.00***
Шамора	0.9827***	0.9322***	0.4787***	0.6034***	–	37.17***	36.53***	50.98***
Седанка	0.9033***	0.9027***	0.5161***	0.6043***	0.6708***	–	35.66***	51.59***
Акур	0.5681***	0.6789***	0.2989***	0.3987***	0.3618***	0.2919***	–	34.58***
Смольный	0.7199***	0.7478***	0.1972***	0.4148***	0.8886***	0.8492***	0.4798***	–

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Тестирование нейтральности мтДНК с использованием тестов Таджimy (Tajima, 1989) и Фу (Fu, 1997) оказалось достоверным только для трех исследованных популяций (табл. 5): популяции *S. malma malma* оз. Крокур и двух популяций *S. malma krascheninnikovi* (р. Лесной и р. Шамора). При этом для всех трех популяций достоверным оказался тест Таджimy, в то время как тест Фу оказался достоверным только для популяции р. Шамора.

Для реконструкции филогенетических связей между гаплотипами мтДНК были построены деревья минимальной протяженности (MST) (рис. 1, 2). Структура генеалогии гаплотипов *S. malma malma* является радиальной с центральным, предположительно предковым гаплотипом N1. Большая часть остальных гаплотипов является производной от N1 и отличается от него 1–3 мутациями (рис. 1). Для филогенетической группы *S. malma krascheninnikovi* характерны структурированность в генеалогии гаплотипов и наличие нескольких филогрупп (рис. 2). При этом распределение филогрупп не связано с географической локализацией популяций.

Таблица 5. Тесты нейтральности мтДНК в популяциях гольцов рода *Salvelinus* Таджики (D) (Tajima, 1989) и F_s (F_s) (Fu, 1997)

Вид	Популяция	D	P	F_s	P
<i>S. malma malma</i>	Оз. Крокур	-2.297	0.001	1.791	0.773
	Р. Кроноцкая	-0.974	0.170	1.832	0.804
	Кл. Холодный	-1.444	0.059	0.764	0.693
	Руч. Лагерный	0.544	0.761	1.907	0.792
	Р. Ола	-1.256	0.086	-0.495	0.231
	Руч. Кулькуты	-0.972	0.191	0.568	0.399
<i>S. malma krascheninnikovi</i>	Руч. Безымянный	0.000	1.000	0.000	N.A.
	Руч. Анива	-0.936	0.185	-1.492	0.259
	Р. Лесная	-1.632	0.029	0.595	0.599
	Р. Вал	1.295	0.926	-1.679	0.225
	Р. Шамора	-1.140	0.039	-1.290	0.049
	Р. Седанка	-0.809	0.233	0.045	0.411
	Р. Акур	0.027	0.562	0.654	0.655
	Руч. Смольный	-0.583	0.325	1.914	0.797

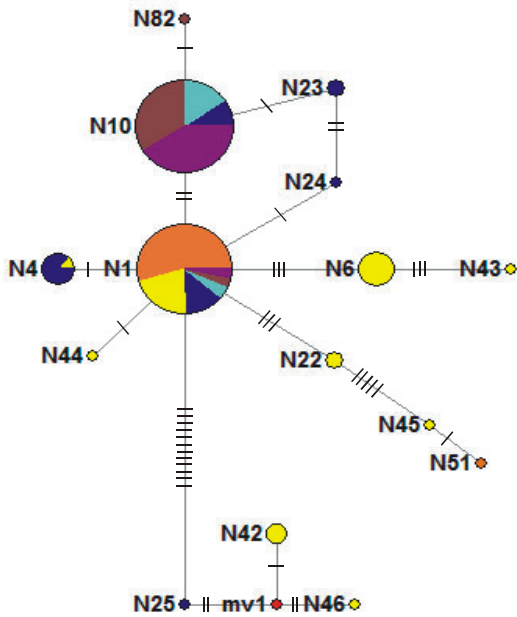
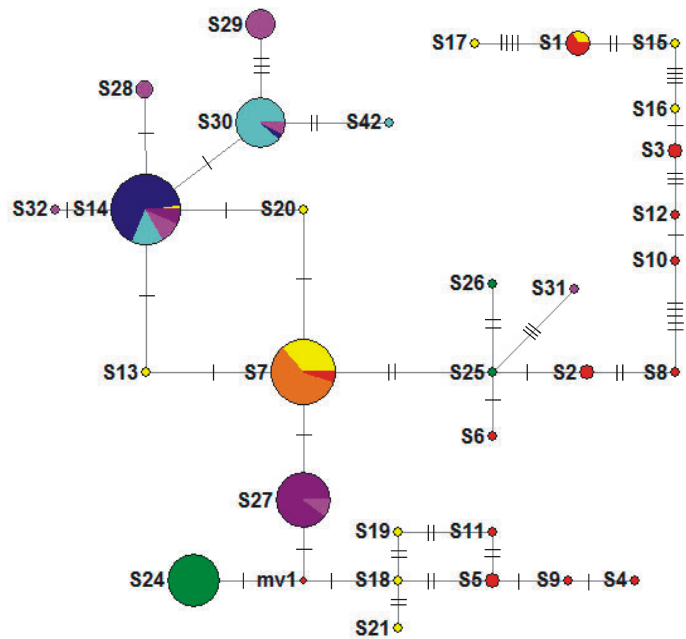


Рис. 1. Генеалогическая сеть гаплотипов мтДНК популяций *S. malma malma*. Размер окружности пропорционален частоте мтДНК в выборке, на ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами. Интервал поиска медианных векторов (mv) равен нулю. Цветами обозначены гаплотипы популяции: оранжевый – оз. Крокур, желтый – р. Кроноцкая, синий – кл. Холодный, голубой – руч. Лагерный, коричневый – р. Ола, фиолетовый – руч. Кулькуты.

Рис. 2. Генеалогическая сеть гаплотипов мтДНК



популяций *S. malma krascheninnikovi*. Размер окружности пропорционален частоте мтДНК в выборке, на ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами. Интервал поиска медианных векторов (mv) равен нулю. Цветами обозначены гаплотипы популяции: оранжевый – руч. Безымянный, желтый – руч. Анива, темно-зеленый – р. Лесная, красный – р. Вал, синий – р. Шамора, голубой – р. Седанка, розовый – р. Акур, фиолетовый – руч. Смольный.

популяций *S. malma krascheninnikovi*. Размер окружности пропорционален частоте мтДНК в выборке, на ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами. Интервал поиска медианных векторов (mv) равен нулю. Цветами обозначены гаплотипы популяции: оранжевый – руч. Безымянный, желтый – руч. Анива, темно-зеленый – р. Лесная, красный – р. Вал, синий – р. Шамора, голубой – р. Седанка, розовый – р. Акур, фиолетовый – руч. Смольный.

Микросателлитный анализ популяций гольцов рода *Salvelinus*. В результате анализа изменчивости 10 микросателлитных локусов у 321 особи гольцов рода *Salvelinus* было выявлено 177 аллелей, наиболее изменчивым оказался локус Smm-24 с максимальным количеством аллелей равным 55, а наименее изменчивым локус Smm-5 с тремя аллельными вариантами. В 6 популяциях локус Smm-5 оказался мономорфным, при этом мономорфные локусы чаще встречаются в популяциях *S. malma krascheninnikovi* (локусы Smm-21, Smm-3, Smm-5 и Ogo1a), чем в популяциях *S. malma malma* (Ogo1a, Smm-5). Минимальная длина аллеля составила 60 п.н. в локусе Omy301, а максимальная 382 п.н. в локусе Smm-24. Число аллелей на локус на популяцию варьирует от 2.5 до 8.5 (от 2.35 до 5.66 при коррекции на минимальный объем выборки ($n=11$)), при этом среднее значение для популяций *S. malma malma* оказалось выше, чем для популяций *S. malma krascheninnikovi* (6.6 и 4.25; 5.01 и 3.62 соответственно). Количество приватных аллелей на локус на популяцию варьировало от 0.049 до 0.792 и в среднем составило для популяций *S. malma malma* 0.4222 и 0.3274 для *S. malma krascheninnikovi*. Значения ожидаемой гетерозиготности варьировали от 0.948 (Smm-24) до 0.029 (Ssa197), в среднем для популяций *S. malma malma* составили 0.523, для *S. malma krascheninnikovi* 0.409 (табл. 6).

Рассчитанные для всех пар выборок оценки F_{st} и R_{st} оказались достоверными ($P < 0.01$). F_{st} значения варьировали от минимального 0.0329 (Кулькuty–Ола) до максимального 0.4156 (Безымянный–Седанка), R_{st} от 0.0277 (Ола–Лагерный) до 0.577 (Шамора–Седанка) (табл. 7 и 8).

Таблица 6. Средние показатели генетической изменчивости 10 микросателлитных локусов в популяциях гольцов рода *Salvelinus*

Вид	Популяция	N	A/Ag	Apr	Ho	He	HW	M/M'
<i>S. malma malma</i>	Оз. Крокур	35	5.70/4.11	0.1114	0.460	0.481	NS	0.754/0.436
	Р. Кроноцкая	12	4.60/4.62	0.0549	0.499	0.462	NS	0.709/0.419
	Кл. Холодный	24	5.80/4.35	0.3524	0.449	0.428	NS	0.699/0.469
	Руч. Лагерный	25	7.10/5.65	0.7922	0.660	0.645	NS	0.597/0.475
	Р. Ола	26	8.00/5.65	0.4817	0.442	0.533	0.174	0.683/0.441
	Руч. Кулькuty	31	8.50/5.66	0.7406	0.571	0.589	NS	0.699/0.547
	Среднее		6.62/5.01	0.4222	0.514	0.523		
<i>S. malma krascheninnikovi</i>	Руч. Безымянный	24	2.50/2.35	0.0568	0.300	0.309	NS	0.499/0.177
	Руч. Анива	31	7.30/5.31	0.4785	0.439	0.526	0.169	0.689/0.452
	Р. Лесная	30	4.40/3.89	0.5744	0.443	0.468	NS	0.688/0.307
	Р. Шамора	32	3.20/2.89	0.1241	0.328	0.336	NS	0.692/0.281
	Р. Седанка	31	2.50/2.42	0.0488	0.262	0.351	0.259	0.704/0.256
	Р. Акур	20	5.60/4.85	0.6815	0.445	0.468	NS	0.713/0.376
	Среднее		4.25/3.62	0.3274	0.369	0.409		

Примечание: N – объем выборки, A – число аллелей в локусе, Ag – то же, скорректированное на минимальный объем выборки ($n=11$), Apr – показатель разнообразия приватных аллелей, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, HW – значимость нарушения равновесия Харди-Вайнберга, приведены только значимые значения ($P < 0.05$), различия не достоверны – NS, M – показатель прохождения популяции через “горлышко бутылки”, M' – модифицированный показатель M.

Таблица 7. Значения F_{st} (ниже диагонали) и R_{st} (выше диагонали) между популяциями *S. malma malma* по данным микросателлитного анализа

Популяции	Крокур	Кроноцкая	Холодный	Лагерный	Ола	Кулькуты
Крокур	–	0.1620***	0.3998***	0.2558***	0.1657***	0.1293***
Кроноцкая	0.2672***	–	0.4155***	0.2034***	0.1239***	0.0289***
Холодный	0.3406***	0.1159***	–	0.0958***	0.1334***	0.3501***
Лагерный	0.2311***	0.1822***	0.2206***	–	0.0277***	0.1381***
Ола	0.2902***	0.0921***	0.1009***	0.1514***	–	0.0713***
Кулькуты	0.2781***	0.1265***	0.1428***	0.1229***	0.0329***	–

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Таблица 8. Значения F_{st} (ниже диагонали) и R_{st} (выше диагонали) между популяциями *S. malma krascheninnikovi* по данным микросателлитного анализа

Популяции	Безымянный	Анива	Лесная	Шамора	Седанка	Акур
Безымянный	–	0.1024***	0.3554***	0.2524***	0.2126***	0.2304***
Анива	0.1032***	–	0.1136***	0.2608***	0.1277***	0.2139***
Лесная	0.3111***	0.1189***	–	0.5771***	0.5445***	0.3092***
Шамора	0.3738***	0.1926***	0.2701***	–	0.2091***	0.2096***
Седанка	0.4156***	0.2048***	0.2404***	0.2759***	–	0.3153***
Акур	0.3184***	0.0888***	0.1256***	0.2072***	0.1726***	–

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

На основании оценок дистанций D_{CE} и $(\delta\mu)^2$ были построены NJ-деревья (рис. 3), имеющие сходную топологию. На обоих деревьях хорошо выделены два основных кластера с высокой бутстреп-поддержкой, в один входят популяции *S. malma malma*, а в другой – *S. malma krascheninnikovi*. NJ-дерево, основанное на хорд-дистанциях Кавалли-Сфорца, лучше отражает региональный компонент, разделяя выборки *S. malma krascheninnikovi* из Сахалина и Приморья на два кластера. В то же время, дистанции, основанные на средней длине аллеля $(\delta\mu)^2$, более устойчиво выделяют группы популяций с Камчатки и Магадана.

Для тестирования прохождения популяций через “горлышко бутылки” были использованы три различных теста программы BOTTLENECK 1.2.02 (Piry et al., 1999), использующие мутационные модели IAM, TPM и SMM (табл. 9). Также в программе BOTTLENECK было рассчитано смещение распределения частот аллелей микросателлитных локусов (рис. 4).

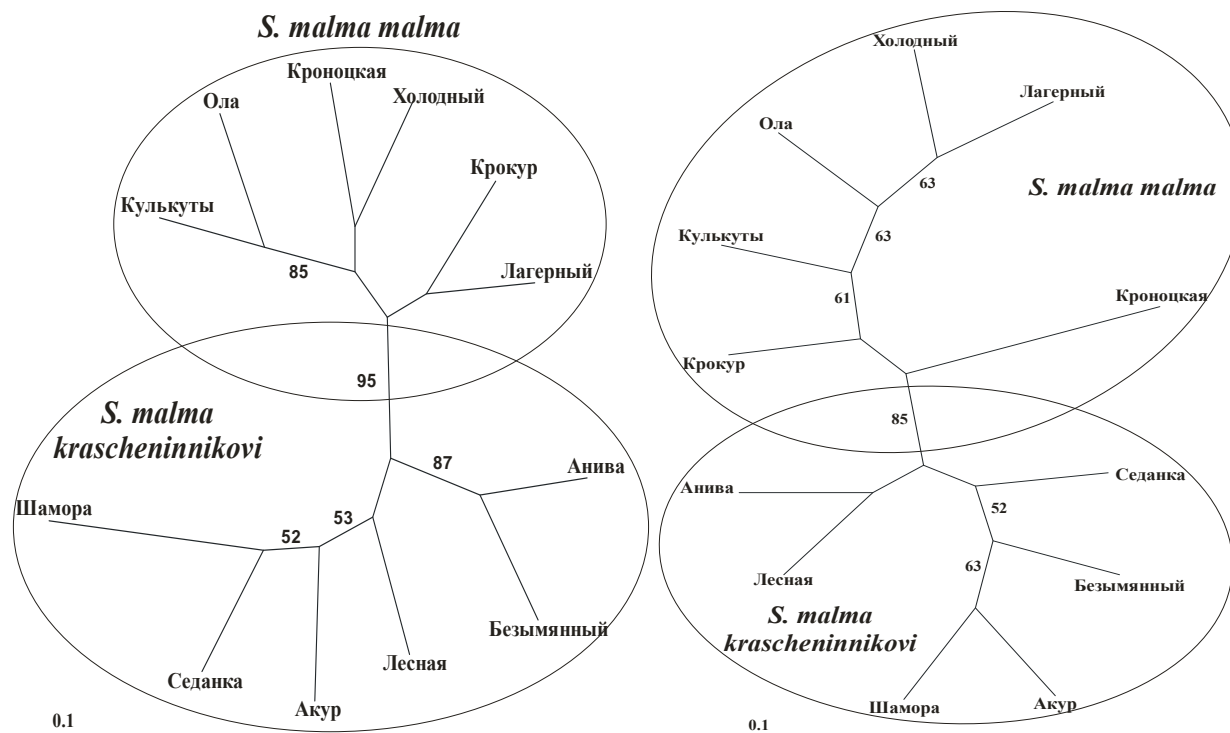


Рис. 3. Взаимоотношения между популяциями гольцов рода *Salvelinus*, консенсусные NJ-деревья, построенные на основе D_{CE} дистанции (слева) и $(\delta\mu)^2$ дистанции (справа). Оценки бутстреп-поддержки (% от 1000 псевдореплик) приведены только для тех точек ветвления, которые воспроизводятся более чем в 50% деревьев.

Таблица 9. Результаты проверки прохождения популяциями гольцов рода *Salvelinus* “горлышка бутылки” с помощью трех тестов программы BOTTLENECK (Piry et al., 1997)

Популяция	Тест, мутационная модель, вероятность*								
	Знаков			Стандартизованных различий			Уилкоксона		
	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM	IAM	TPM	SMM
Оз. Крокур	0.097	0.359	0.627	0.038	0.290	0.167	0.976/0.064	0.715/0.326	0.326/0.715
Р. Кроноцкая	0.361	0.324	0.315	0.318	0.063	0.002	0.500/0.545	0.179/0.849	0.125/0.898
Кл. Холодный	0.278	0.095	0.000	0.123	0.006	0.000	0.080/0.935	0.016/0.989	0.000/1.000
Руч. Лагерный	0.142	0.063	0.000	0.201	0.173	0.000	0.958/0.053	0.042/0.984	0.000/1.000
Р. Ола	0.364	0.134	0.005	0.109	0.000	0.000	0.326/0.715	0.102/0.918	0.007/0.995
Руч. Кулькуты	0.241	0.015	0.016	0.359	0.015	0.000	0.385/0.652	0.012/0.991	0.002/0.999
Руч. Безымянный	0.364	0.558	0.518	0.292	0.409	0.086	0.629/0.422	0.422/0.629	0.191/0.844
Руч. Анива	0.616	0.128	0.036	0.426	0.056	0.000	0.674/0.367	0.125/0.898	0.005/0.997
Р. Лесная	0.014	0.104	0.367	0.008	0.067	0.426	1.000/0.004	0.980/0.027	0.594/0.469
Р. Шамора	0.457	0.169	0.050	0.479	0.099	0.001	0.545/0.500	0.179/0.849	0.064/0.976
Р. Седанка	0.062	0.278	0.317	0.025	0.098	0.370	0.992/0.012	0.973/0.039	0.711/0.343
Р. Акур	0.187	0.527	0.251	0.129	0.431	0.144	0.902/0.125	0.629/0.422	0.191/0.844

* Для теста Уилкоксона приведены результаты проверки односторонней гипотезы дефицита/избытка гетерозиготности.

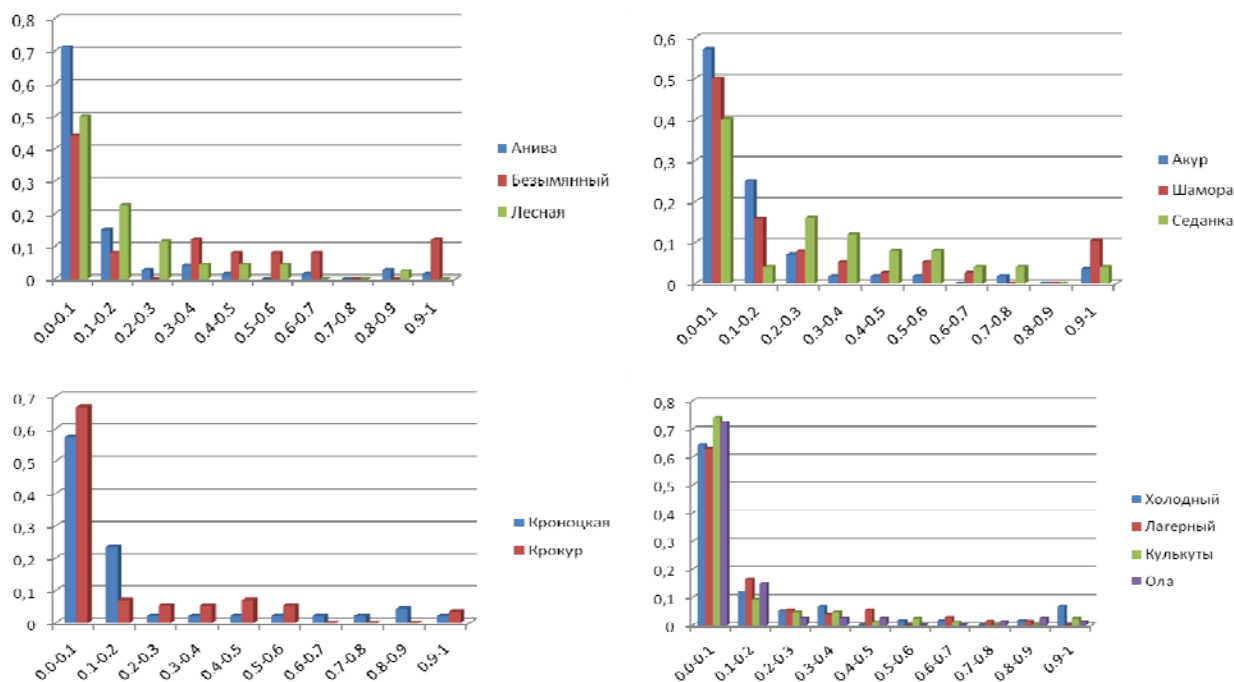


Рис. 4. Распределение частот аллелей микросателлитных локусов в популяциях гольцов рода *Salvelinus*, рассчитанное с помощью программы BOTTLENECK (Piry et al., 1999). По оси ординат – пропорции аллелей, по оси абсцисс – частоты аллелей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ митохондриальной ДНК популяций гольцов рода *Salvelinus*. Полученные данные анализа изменчивости митохондриального генома популяций *S. malma malma* и *S. malma krascheninnikovi* согласуются с ранее опубликованными данными (Олейник и др., 2005, 2007). Средние значения разнообразия гаплотипов и уровень нуклеотидной изменчивости исследованных популяций *S. malma malma* (0.3939 ± 0.0797 и 0.001281) оказались немного ниже соответствующих оценок для популяций северной азиатской мальмы (0.4232 ± 0.1132 и 0.001208). Структура генеалогии гаплотипов является радиальной (рис. 1). Предположительно, предковым гаплотипом является N1, что также согласуется с ранее опубликованными результатами (Олейник и др., 2005, 2007). Подобная структура гаплотипической сети свидетельствует о том, что в ходе своего исторического развития популяции *S. malma malma* прошли через “горлышко бутылки” с последующим увеличением численности. Относительная молодость группы подтверждается небольшим количеством гаплотипов и малой глубиной дивергенции между ними, поскольку основные “северные” гаплотипы мтДНК отличаются друг от друга 1–2 нуклеотидными заменами.

Средние значения разнообразия гаплотипов и уровня нуклеотидной изменчивости исследованных популяций южной азиатской мальмы (0.4022 ± 0.0639 и 0.001343) оказались в два раза ниже по сравнению с ранее полученными данными для анадромных популяций *S. malma krascheninnikovi* (0.8609 ± 0.1044 и 0.003061). Подобное расхождение, очевидно, связано с непропорциональностью использованных выборок. Очевидно, что полное

отсутствие изменчивости в популяции руч. Безымянного вносит значительное смещение в средние оценки разнообразия мтДНК популяций *S. malma krascheninnikovi*.

По данным PCR-RFLP анализа мтДНК филогенетическая группа *S. malma krascheninnikovi* характеризуется большой дисперсией различий между гаплотипами, сложной структурой гаплотипической сети (рис. 2) и наличием большого количества альтернативных связей разной длины, которые возникают в результате обратных или параллельных мутаций, приводящих к образованию множественных замкнутых циклов. Распределение гаплотипов не ассоциировано с географической локализацией популяций. Такая структура свидетельствует о длительной эволюции популяций *S. malma krascheninnikovi* в стабильных условиях при отсутствии значительных изменений численности на протяжении многих поколений (Олейник и др., 2002, 2010; Oleinik et al., 2004).

Влияние изоляции на изменчивость мтДНК в популяциях гольцов рода *Salvelinus*.

Для описания влияния изоляции на генетические характеристики популяций гольцов рода *Salvelinus* было рассмотрено четыре разные модельные системы, включающие: популяции, изолированные естественными барьерами, популяции жилых гольцов, изолированные популяции, полученные в ходе искусственной фрагментации ареала, и интродуцированные популяции.

Модельная система 1. Изолированные популяции руч. Безымянного и р. Лесной, являющихся естественными изолятами, время образования которых приблизительно известно, представляют огромный интерес, так как позволяют проследить влияние дрейфа генов на популяцию за довольно длительный исторический период.

Из всего разнообразия гаплотипов в филогенетической группе *S. malma krascheninnikovi* в популяции ручья Безымянного выявлен всего один гаплотип S7 (100%). Этот гаплотип является доминирующим гаплотипом в контрольной популяции ручья Анива, где он встречается с частотой 57%. Для популяции *S. malma krascheninnikovi* руч. Безымянного показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия равны нулю. Принимая во внимание высокий уровень изменчивости мтДНК *S. malma krascheninnikovi*, полученные оценки нельзя отнести к ошибке выборки.

Почти полное отсутствие изменчивости мтДНК также было обнаружено при исследовании 15 популяций арктического гольца *S. alpinus* (изолированные озера в Альпах) (Brunner et al., 1998) и такой же низкий уровень генетической изменчивости мтДНК был обнаружен и в 7 озерных популяциях *S. alpinus* в Шотландии (Hartley et al., 1992). Авторы обсуждают две возможности, объясняющие практически полное отсутствие изменчивости мтДНК в исследованных популяциях *S. alpinus*. Наиболее вероятным, по их мнению, является прохождение вида через “горлышко бутылки” в период последнего оледенения в этом районе Европы. Сходный сценарий также предложен и для объяснения уменьшения

уровня генетической изменчивости мтДНК у других северных рыб, таких как сиги рода *Coregonus* (Bernatchez, Dodson, 1994). Однако подобное объяснение неприемлемо для популяций *S. malma krascheninnikovi*. По мнению исследователей (Гриценко, 1975; Олейник и др., 2010), южная азиатская мальма *S. malma krascheninnikovi* сформировалась в один из межледниковых периодов и длительное время, достаточное для образования существенных различий, в том числе генетических, находилась в изоляции на территориях, не подвергавшихся оледенению (Гриценко и др., 1998).

Изоляция популяции руч. Безымянного определялась вулканическими и тектоническими процессами, которые имели место в сахалино-курильском регионе в четвертичном периоде (Линдберг, 1972) и привели к образованию физических изолирующих преград. В связи с прекращением потока генов, связанного с возникновением естественного барьера и прекращением миграции, популяция *S. malma krascheninnikovi* руч. Безымянного в ходе своего исторического развития, возможно, прошла либо через одну, либо через несколько фаз низкой численности, что привело, в конечном итоге, к фиксации одного гаплотипа мтДНК.

Природная популяция *S. malma krascheninnikovi* р. Лесной, как и популяция руч. Безымянного, находится на стадии фиксации одного гаплотипа мтДНК. Считается, что изоляция р. Лесной от моря, скорее всего, связана с последним извержением вулкана Менделеева, произошедшим около 30–40 тыс. лет назад, в результате чего образовался выход серных вод на поверхность (Салменкова, Омельченко, 2000).

Значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия в популяции р. Лесной оказались значимо ниже не только соответствующих оценок контрольной популяции *S. malma krascheninnikovi* р. Вал, но и средних оценок для популяций южной азиатской мальмы. Результаты анализа мтДНК однозначно показывают, что в своей истории популяция испытала сокращение численности, что привело к значительному снижению уровня генетического разнообразия. Таким образом, современная генетическая структура популяции *S. malma krascheninnikovi* р. Лесной отражает эффект “горлышка бутылки” как проявление случайного действия дрейфа генов в условиях географической изоляции.

Тест нейтральности мтДНК Таджимы (Tajima, 1989) (табл. 5) оказался достоверным для р. Лесной и также свидетельствует об изменениях популяционной численности: уменьшение размера популяции в связи с прохождением через “горлышко бутылки” (Peek et al., 2000) с последующим периодом экспоненциального роста (Drummond, Suchard, 2008; Yang, 2008).

Модельная система 2. В реках юга Приморского края проходная мальма практически не встречается, но при этом обитает жилая ручьевая форма. Нами было изучено две популяции ручьевых гольцов из р. Шамора и руч. Смольный. Обе популяции находятся на стадии фиксации одного гаплотипа мтДНК: в популяции р. Шамора наблюдается фиксация гаплотипа S14, в то время как в руч. Смольный доминирует гаплотип S27. Оба этих

гаплотипа были обнаружены и в популяции р. Акур, являющейся контрольной для *S. malma krascheninnikovi* Приморского края. Значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия в популяции р. Шамора оказались гораздо ниже не только оценок контрольной популяции р. Акур, но и популяции руч. Смольный (табл. 2). Тестирование нейтральности мтДНК оказалось достоверным только для популяции р. Шамора при использовании как теста Таджимы (Tajima, 1989), так и теста Фу (Fu, 1997), что свидетельствует об изменениях популяционной численности (Peek et al., 2000; Drummond, Suchard, 2008).

Таким образом, наличие общих гаплотипов с анадромной мальмой из р. Акур и низкие уровни генетической изменчивости популяций р. Шамора и руч. Смольный могут быть связаны с периодическими понижениями численности популяций, вследствие прохождения через “горлышко бутылки”. Этому, вероятно, могут способствовать экстремальные условия обитания жилых популяций, в том числе смена засушливого лета и холодных малоснежных зим.

Морфологические признаки популяции мальмы кл. Холодного были описаны Волобуевым (Волобуев, 1978), который отнес ее к карликовой форме. В связи с тем, что в ключе не было обнаружено анадромной мальмы, гольца из кл. Холодного принято считать жилой формой *S. malma malma*. Очевидно, что жилая форма гольцов образовалась от проходной мальмы (Волобуев, 1978). Это подтверждается нашими данными, в частности, присутствием в популяции кл. Холодного гаплотипа N1. Данный гаплотип, вероятно, является предковым гаплотипом популяции *S. malma malma*, поскольку в настоящее время с высокой частотой встречается в популяциях гольцов как Азии, так и Северной Америки (Олейник и др., 2005). В кл. Холодном гаплотип N1 является доминирующим и обнаружен у 34% особей в популяции, но гаплотипы N4 и N10 также представлены значительным числом особей (25% каждый).

Значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия популяции кл. Холодного оказались значительно выше показателей контрольных популяций из р. Ола и руч. Кулькuty, в котором встречаются как жилая, так и проходная формы, а также изолированной популяции руч. Лагерного (табл. 2) и опубликованных средних оценок для анадромных популяций северной азиатской мальмы (0.4232 ± 0.1132 и 0.001208) (Олейник и др., 2005, 2007). Значения F_{st} также оказались выше при сравнении кл. Холодного с близлежащими контрольными популяциями, в то время как в паре Холодный–Кроноцкая были выявлены минимальные оценки F_{st} (табл. 3).

Большое количество близкородственных гаплотипов в генеалогии *S. malma malma* кл. Холодного, объединенных в одну радиальную структуру, свидетельствует о том, что предковая популяция прошла через стадию резкого сокращения численности, и в настоящий момент находится в состоянии экспоненциального роста. Носителями уникальных гаплотипов, вероятно, являются карликовые гольцы. Тем не менее, не исключено, что

представление об изоляции жилой популяции кл. Холодного от проходной мальмы может оказаться недостаточно точным. Сохранение редких гаплотипов мтДНК, а также поддержание высоких частот нескольких доминирующих гаплотипов, предположительно, может быть обусловлено благоприятными климатическими условиями, достаточными пищевыми ресурсами и исходно большим эффективным размером популяции, обеспечивающим поддержание генетического разнообразия.

Модельная система 3. В связи с усиливающимся антропогенным воздействием особый интерес представляет изучение популяций, подвергшихся искусственной фрагментации ареала. Популяция *S. malma krascheninnikovi* из р. Седанка оказалась изолированной в 1936 году после постройки плотины и образования водохранилища. За время изоляции произошла фиксация редкого для других популяций гаплотипа S30, а также появление уникального гаплотипа S42. Сходная ситуация описана для популяций *Salvelinus confluentus* (Kanda, Allendorf, 2001), где было показано, что при низком уровне генетической изменчивости дрейф генов может привести к тому, что большинство популяций будут иметь одинаковые аллели или несколько популяций будут иметь высокие частоты редких аллелей. В популяции р. Седанка произошло снижение уровней гаплотипического и нуклеотидного разнообразия по сравнению с контрольной популяцией р. Акур. В то же время, оценки разнообразия оказались в несколько раз выше значений в популяциях р. Шамора и руч. Смольного, что, возможно, связано с исходно большим эффективным размером популяции р. Седанка. Подобную картину можно объяснить и тем, что при одинаковых условиях потеря генетической изменчивости происходит быстрее в популяциях с небольшим местом обитания, при этом последствия фрагментации могут проявляться не сразу, а только через несколько поколений. Также известно, что скорость утраты изменчивости зависит не только от площади, но и от качества местообитания (числа заводов, количества пищевых ресурсов, наличия хищников и так далее) (Ezard, Travis, 2006; Letcher et al., 2007; Morita et al., 2009).

Популяция *S. malma malma* руч. Лагерного также находится на стадии фиксации одного гаплотипа мтДНК. Основной гаплотип данной популяции (N10) был обнаружен и в других популяциях северо-западного побережья Охотского моря (рис. 1) и является доминирующим в контрольных популяциях *S. malma malma* из р. Ола и руч. Кулькуты. Во всех трех популяциях также был обнаружен предковый гаплотип N1, вокруг которого другие гаплотипы формируют радиальную структуру. Значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия популяции руч. Лагерного оказались выше оценок контрольных популяций, но не средних показателей для *S. malma malma*. Возможно, подобная картина связана с ошибкой выборки популяции руч. Лагерного, состоящей всего из 13 особей.

Модельная система 4. Популяция *S. malma malma* оз. Крокур представляет особый интерес. Источником генетического материала послужила чрезвычайно гетерогенная популяция р. Кроноцкой, при этом интродукция осуществлялась несколько раз. В связи с

этим можно было ожидать, что первоначально показатели генетической изменчивости выборки, перенесенной в оз. Крокур, соответствовали средним оценкам природных популяций *S. malma malma*.

За очень короткий отрезок времени в условиях изоляции (около 25 лет), мы наблюдаем практически гомогенную популяцию, что полностью соответствует вероятному распределению частот гаплотипов при случайном генетическом дрейфе. Тестирование нейтральности мтДНК с использованием теста Таджимы (Tajima, 1989) оказалось достоверным для популяции *S. malma malma* оз. Крокур (табл. 5), что свидетельствует об изменениях популяционной численности, связанной, скорее всего, с экспоненциальным ростом популяции (Drummond, Suchard, 2008; Yang, 2008). В пользу данной гипотезы говорит то, что на протяжении длительного периода в озере не наблюдалось никаких свидетельств удачной интродукции, и только в последние годы было отмечено присутствие большого количества особей.

Потеря генетического разнообразия в популяции *S. malma malma* оз. Крокур, вероятнее всего, была ускорена небольшой эффективной численностью интродуцированных выборок, особенностями среды обитания, прекращением миграции, ограниченной численностью созданной искусственной популяции и инбридингом. Доказательством инбридинга является наличие в озере гольцов с ярко выраженными морфологическими изменениями.

Анализ микросателлитных локусов ядерного генома популяций гольцов рода *Salvelinus*. Полученные нами данные разнообразия 10 микросателлитных локусов свидетельствуют о том, что в популяциях *S. malma malma* поддерживается более высокий уровень изменчивости по сравнению с *S. malma krascheninnikovi*. В то же время, для северной мальмы характерна более низкая генетическая дифференциация популяций. Результаты анализа пространственной изменчивости аллозимных локусов ядерного генома, напротив, выявляют низкий уровень генетического разнообразия у северной мальмы, но подтверждают отсутствие четких региональных различий между популяциями (Осинов, 2001, 2002).

В популяциях *S. malma krascheninnikovi* наблюдаются более низкие оценки генетической изменчивости микросателлитных локусов по сравнению с северной азиатской и американской мальмой. Данный факт, скорее всего, связан с разной демографической историей *S. malma malma* и *S. malma krascheninnikovi*. В то время как южная азиатская мальма долгое время существовала в стабильных условиях при отсутствии значительных изменений численности (Олейник и др., 2005, 2007, 2010), популяции *S. malma malma*, прошедшие через “горлышко бутылки” в рефугиуме, быстро увеличили свою численность, осваивая новые территории, и за счет высокой скорости эволюции микросателлитных локусов, восстановили, а, возможно, даже увеличили изменчивость ядерных локусов (Gordeeva et al., 2010). Данная гипотеза подтверждается и тем, что в популяциях, обитающих

в холодных водах и на недавно колонизированных территориях, наблюдаются более высокие уровни генетического разнообразия (Brooker et al., 1994; McConnell et al., 1995; Roman, 2006).

Влияние изоляции на микросателлитные локусы в популяциях гольцов рода *Salvelinus*.

Модельная система 1. Анализ микросателлитных локусов популяции *S. malma krascheninnikovi* руч. Безымянного выявил более низкие показатели генетической изменчивости по сравнению как с контрольной популяцией руч. Анива (табл. 6), так и средними значениями для *S. malma krascheninnikovi*. Снижение генетического разнообразия в популяции руч. Безымянного наблюдается и по аллозимным локусам ядерного генома (Омельченко и др., 1998). Авторы связывают эти различия с изоляцией популяции *S. malma krascheninnikovi* непроходимым водопадом. Таким образом, в изолированной популяции руч. Безымянного наблюдается одновременное снижение генетических показателей по двум ядерным маркерам.

Тестирование популяции руч. Безымянного с помощью программы BOTTLENECK 1.2.02 не выявило эффекта “горлышка бутылки” ни по одной из использованных моделей (табл. 9). В то же время, индекс M и снижение количества приватных аллелей свидетельствуют в пользу того, что популяция в ходе своего развития подверглась влиянию дрейфа генов (табл. 6). Одновременно с этим, в популяции руч. Безымянного нарушается L-образное распределение частот аллелей (рис. 4), что также свидетельствует о влиянии дрейфа генов (Luikart et al., 1998). Подобная же картина наблюдалась и при анализе микросателлитных локусов популяции *S. malma krascheninnikovi* оз. Осочного (Осинов, Гордеева, 2008), в которой также ни по одному из тестов BOTTLENECK не было выявлено эффекта “горлышка бутылки”, в то время как другие тесты (низкие показатели генетической изменчивости и индекс M) указывали на прохождение популяцией через фазу низкой численности. Скорее всего, это связано с тем, что использование тестов BOTTLENECK предполагает соблюдение некоторых допущений, в том числе и наличие равновесия Харди-Вайнберга по всем локусам (Осинов, Гордеева, 2008), в то время как в популяции руч. Безымянного имеются достоверные отклонения от равновесия по некоторым локусам.

Другая картина наблюдается в природной изолированной популяции р. Лесной. Проведенный анализ 10 микросателлитных локусов не выявил значительного снижения уровня гетерозиготности, ни относительно средних показателей для *S. malma krascheninnikovi*, ни средних значений для контрольной популяции руч. Анива (табл. 6).

Тестирование популяции на прохождение через “горлышко бутылки” также было неоднозначным (табл. 9). Достоверными оказались все тесты IAM и один тест модели TPM (содержащей 30% IAM), хотя считается (Nei, Kumar, 2000), что лучше всего для описания изменений, происходящих в популяциях, подходит модель SMM. Кроме того, распределение частот аллелей в популяции р. Лесной соответствует L-образному распределению (рис. 4),

характерному для популяций не прошедших через “горлышко бутылки”. Из всех тестов только индекс M' (табл. 6) оказался ниже значения проходной мальмы руч. Анива.

Анализ аллозимных локусов ядерного генома в популяции *S. malma krascheninnikovi* р. Лесной (Салменкова, Омельченко, 2000) показал, что по многим показателям она фактически не отличается от неизолированных популяций. Высокую гетерозиготность авторы объясняют большой численностью изолированной популяции (Салменкова, Омельченко, 2000). Таким образом, изолированная популяция *S. malma krascheninnikovi* р. Лесной по уровню гетерозиготности и другим показателям полиморфизма как аллозимных (Салменкова, Омельченко, 2000), так и микросателлитных локусов (табл. 6) не отличается от неизолированных курильских популяций.

Модельная система 2. Жилая популяция *S. malma krascheninnikovi* р. Шамора характеризуется более низкими показателями генетической изменчивости микросателлитных локусов по сравнению с контрольной популяцией р. Акур (табл. 6). Тестирование популяции разными способами показало наличие эффекта “горлышка бутылки” для тестов SMM (табл. 9) и индекса M/M' (табл. 6). Также наблюдается небольшое смещение в распределении частот аллелей (рис. 4), что говорит о периодических колебаниях численности популяции.

Показатели генетической изменчивости в популяции жилых гольцов *S. malma malma* кл. Холодного оказались ниже соответствующих показателей контрольных выборок из р. Ола и руч. Кулькиты на 22 и 35 процентов. Подобная же картина наблюдалась у атлантического лосося (*Salmo salar* L.) при искусственном разведении (Reilly et al., 1999), изменение генетического разнообразия которого, скорее всего, связано со снижением эффективного размера популяции, что сильнее отражается на микросателлитных локусах, имеющих большое число аллелей на локус и высокую гетерозиготность.

Проведенное нами тестирование популяции кл. Холодного выявило эффект “горлышка бутылки” для модели SMM (табл. 9) и для изменений в распределении частот аллелей (рис. 4), но не для индекса M/M' (табл. 6). Как отмечается (Garza, Williamson, 2001) в небольших равновесных популяциях могут наблюдаться высокие значения индекса M , но если в популяциях выявлено низкое аллельное разнообразие, то это может указывать на снижение их численности в отдаленном прошлом.

Модельная система 3. Искусственно изолированная популяция р. Седанка показала наименьшие оценки изменчивости микросателлитных локусов среди популяций *S. malma krascheninnikovi* Приморского края. Подобные же значения гетерозиготности и количества аллелей были обнаружены и в двух популяциях *S. malma krascheninnikovi* из озер Осочное и Моховое о. Сахалин (Осинов, Гордеева, 2008). Несмотря на то, что индекс M превышает пороговое значение в 0.7, характерное для равновесных популяций, низкое аллельное разнообразие и распределение частот аллелей (рис. 4) указывает на редукцию их численности (Garza, Williamson, 2001). Из полученных данных можно сделать вывод, что в популяции р. Седанка,

подвергшейся фрагментации ареала, за 70 лет произошло значительное снижение генетической изменчивости микросателлитных локусов, и популяция в ходе своего развития прошла через фазу низкой численности, т.е. “горлышко бутылки”.

Совершенно другую ситуацию можно наблюдать в изолированной популяции *S. malma malma* руч. Лагерного, в котором не только не произошло снижения уровня изменчивости микросателлитных локусов, а даже наблюдается увеличение количества частных аллелей, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности относительно средних значений контрольных популяций р. Ола и руч. Кулькуты (табл. 6), а также средних для *S. malma malma*. Значения гетерозиготности популяции руч. Лагерного оказались наиболее близки к значениям, опубликованным Крэйн с соавторами (Crane et al., 2004, 2005) для североамериканских популяций *S. malma malma*.

Тестирование популяции на прохождение через “горлышко бутылки” оказалось достоверным для моделей SMM и TMM не только для популяции руч. Лагерного, но также для популяций р. Ола и руч. Кулькуты (табл. 9). Во всех трех популяциях наблюдаются флуктуации в распределении частот аллелей (рис. 4). Индекс M для р. Ола и руч. Кулькуты соответствует пороговому значению в 0.7, но в популяции руч. Лагерного он оказался ниже и составил 0.597 (табл. 6). Таким образом, проведенные тесты указывают на прохождение популяцией руч. Лагерного недавнего “горлышка бутылки”, при этом полученные данные в большей степени свидетельствуют о совместном прохождении популяциями северной части Охотского моря фазы низкой численности.

Модельная система 4. За время существования искусственной популяции оз. Крокур произошло уменьшение аллельного разнообразия на 11.1%, но одновременно с этим количество частных аллелей увеличилось с 0.0549 до 0.1114 (табл. 6). Подобная ситуация наблюдается и в популяциях *Salmo salar* из р. Оулуйоки, где при искусственном разведении за десять поколений произошло снижение разнообразия аллелей на 24.8% (Säisä et al., 2003). Данные свидетельствуют, что снижение генетического разнообразия может быть незначительным или оставаться на том же уровне на протяжении более 50 лет, если эффективный размер популяции будет достаточным для поддержания разнообразия (Säisä et al., 2003; Neville et al., 2007). В популяции оз. Крокур произошло уменьшение средней гетерозиготности, что соответствует данным о снижении, связанном с инбридингом на 1% за поколение при искусственном разведении.

Несмотря на полученные данные о снижении аллельного разнообразия и гетерозиготности, тесты на прохождение популяции через “горлышко бутылки” не дали однозначного результата (достоверным оказался только один тест для модели IAM (табл. 9)). Индекс M и модифицированный M' популяции оз. Крокур оказались выше, чем в популяции р. Кроноцкой (табл. 6). Единственным тестом, показавшим вероятное прохождение популяцией через “горлышко бутылки”, оказалось распределение частот аллелей (рис. 4).

Следовало ожидать более резкого падения уровня генетической изменчивости и исчезновения приватных аллелей в интродуцированной популяции оз. Крокур. В качестве возможных причин наблюдаемого несоответствия можно отметить непропорционально высокую скорость мутирования отдельных микросателлитных локусов, небольшое количество поколений, прошедших с момента интродукции популяции и маскировку “горлышка бутылки” за счет резкого всплеска численности. В пользу высокой скорости мутаций микросателлитных локусов свидетельствует почти двукратное увеличение количества аллелей высокополиморфного локуса Smm-24.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ изменчивости митохондриальной ДНК и микросателлитных локусов ядерной ДНК популяций *S. malma malma* и *S. malma krascheninnikovi* не противоречит ранее выдвинутым гипотезам о демографической истории подвидов (McPhail, 1961; Гриценко, 1975; Осинев, Павлов, 1998; Salmenkova et al., 2000; Осинев, 2001, 2002; Redenbach, Taylor, 2002; Олейник и др., 2002, 2005, 2007, 2010). В то время как популяции *S. malma krascheninnikovi* длительное время существовали в стабильных условиях при отсутствии значительных изменений численности, популяции *S. malma malma* потеряли большую часть изменчивости во время последнего оледенения. После окончания висконсинского оледенения последовало расселение *S. malma malma* по тихоокеанскому побережью (Currants et al., 2003; Redenbach, Taylor, 2002), что сопровождалось увеличением численности. В связи с высокой скоростью мутирования и особенностями наследования микросателлитных локусов, произошло увеличение изменчивости микросателлитных локусов ядерного генома при сохранении низкого уровня разнообразия митохондриальных генов. В пользу недавнего расселения и увеличения численности также говорит слабая дифференциация популяций *S. malma malma* по мтДНК и микросателлитным локусам (Олейник и др., 2002, 2005, 2007; Currants et al., 2003; Crane et al., 2004, 2005). Данная гипотеза подтверждается и тем, что в популяциях, обитающих в холодных водах и на недавно колонизированных территориях, наблюдаются высокие уровни генетического разнообразия (Brooker et al., 1994; McConnell et al., 1995; Roman, 2006).

Эффект дрейфа генов был выявлен как по митохондриальной ДНК, так и по микросателлитным локусам для популяций *S. malma krascheninnikovi* ручья Безымянного, а также р. Шамора и р. Седанка. В то же время, для остальных модельных систем на фоне снижения разнообразия гаплотипов мтДНК наблюдалось увеличение изменчивости микросателлитных локусов.

В популяциях р. Лесной, оз. Крокур и руч. Лагерного наблюдается постепенный переход к гомогенному состоянию по митохондриальным генам, но при этом недостаточно резкое снижение разнообразия ядерных генов. Подобная картина может быть связана с достаточной эффективной численностью популяции для сохранения изменчивости ядерной, но не митохондриальной ДНК.

Такая же картина может наблюдаться при недавнем прохождении популяцией через “горлышко бутылки”, что связано с особенностями наследования двух независимых маркеров (Sinclair et al., 2002).

Популяция кл. Холодного показывает незначительное снижение изменчивости по ядерным генам, а по уровню гаплотипического разнообразия соответствует озерным популяциям, что может говорить о длительном стабильном существовании данной популяции. В то же время, более низкие показатели изменчивости микросателлитных локусов могут свидетельствовать как о прохождении предковой популяцией “горлышка бутылки”, так и об отсутствии потока генов между жилой популяцией кл. Холодного и проходной мальмой.

Таким образом, выявление прохождения популяцией через “горлышко бутылки” по митохондриальным и ядерным генам будет в большей степени зависеть не только от времени прохождения популяцией фазы низкой численности (наиболее заметным эффект “горлышко бутылки” будет по прошествии нескольких десятков поколений), но также эффективного размера оставшейся популяции (при этом проявление эффекта “горлышка бутылки” будет заметнее при анализе мтДНК).

ВЫВОДЫ

1. В природных изолированных популяциях *S. malma krascheninnikovi* (руч. Безымянный, р. Лесная) наблюдается переход к практически гомогенному состоянию по митохондриальной ДНК и снижение аллельного разнообразия микросателлитных локусов ядерной ДНК, как следствие действия случайного дрейфа генов. Изоляция популяций определялась вулканическими и тектоническими процессами в плейстоцене, которые привели к образованию физических изолирующих преград.

2. В популяциях жилых гольцов *S. malma krascheninnikovi* (р. Шамора, руч. Смольный) снижение показателей генетической изменчивости ядерных и митохондриальных генов, вероятно, свидетельствует о периодическом прохождении фаз низкой численности, связанных с экстремальными условиями обитания.

3. В искусственно изолированной популяции *S. malma krascheninnikovi* (р. Седанка) за 70 лет произошло снижение изменчивости мтДНК и микросателлитных локусов ядерной ДНК, что соответствует теории о потере генетического разнообразия при искусственной фрагментации ареала. В то же время показано, что искусственная фрагментация при непродолжительном периоде изоляции практически не оказывает влияния на показатели молекулярного разнообразия популяции (*S. malma malma*, руч. Лагерного).

4. Генеалогия гаплотипов мтДНК *S. malma malma* и результаты тестирования распределения изменчивости микросателлитных локусов на основе пошаговой мутационной модели и индекса M свидетельствуют о прохождении фазы низкой численности, которая может быть связана с предковой популяцией. Высокий уровень молекулярного разнообразия

мтДНК, наряду с пониженной изменчивостью микросателлитных локусов в жилой популяции *S. malma malma* (кл. Холодный), предположительно, может быть обусловлен локальными благоприятными условиями, достаточными пищевыми ресурсами и исходно большим эффективным размером популяции.

5. В интродуцированной популяции *S. malma malma* (оз. Крокур) за короткий промежуток времени произошло значительное снижение разнообразия мтДНК, что соответствует вероятному распределению частот гаплотипов при случайном генетическом дрейфе. Потеря изменчивости микросателлитных локусов соответствует изменениям, связанным с инбридингом, а не ожидаемым потерям гетерозиготности из-за небольшой эффективной численности интродуцированных выборок.

6. Полученные результаты в основном соответствуют следующим теоретическим принципам популяционной генетики: 1) если на частоты аллелей (гаплотипов мтДНК) не оказывают влияния никакие другие процессы или их действием можно пренебречь, эволюция, в конечном счете, приводит к тому, что один из аллелей фиксируется, а все редкие элиминируются из популяции; 2) при одинаковой интенсивности дрейфа генов при прохождении популяцией “горлышка бутылки” она гораздо быстрее теряет изменчивость мтДНК, чем ядерных генов.

7. Полученные в работе данные дают основание считать, что для получения адекватных выводов о влиянии дрейфа генов на генетические характеристики популяции следует использовать комбинированный анализ митохондриальной ДНК и микросателлитных локусов ядерной ДНК.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. 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.
2. Олейник А.Г., Скурихина Л.А., **Чукова Е.И.** Филогеография южной азиатской мальмы *Salvelinus malma krascheninnikovi*: генеалогический анализ митохондриальной ДНК // Генетика. 2010. Т. 46, № 2. С. 226-238.
3. Gordeeva N.V., **Chukova E.I.**, Oleinik A.G. Microsatellite genetic variation of Asian populations of Dolly Varden char // Hydrobiologia. 2010. Vol. 650, №1. P. 133-144.

Публикации в материалах конференций:

1. **Чукова Е.И.** Генетическая дифференциация популяций мальмы *Salvelinus malma* по данным RFLP-PCR анализа митохондриальной ДНК // Конференция студентов, аспирантов и молодых ученых НОЦ ДВГУ “Морская биота”. Владивосток, 28 апреля 2006. Тезисы докладов. С. 10-11.
2. **Чукова Е.И.** Генетическая дифференциация популяций мальмы *Salvelinus malma* по данным RFLP-PCR анализа митохондриальной ДНК // X Международная молодежная конференция по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ, 12-19 сентября 2006. Тезисы докладов. С. 50.
3. **Chukova E.I.**, Oleinik A.G., Skurikhina L.A. Influence of isolation on genetic characteristics of charrs populations of the genus *Salvelinus* // Modern Achievements in population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium, Vladivostok-Vostok Marine Biological Station, September 9-14, 2007: Program & Abstracts. Vladivostok, 2007. P. 10.
4. Олейник А.Г., **Чукова Е.И.**, Скурихина Л.А., Гордеева Н.В. Эффект случайного дрейфа генов в изолированных природных популяциях гольцов рода *Salvelinus* // Международная конференция “Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб”. С-Петербург, 10-12 сентября 2008 г.: Тезисы докладов. Спб.: Изд-во ГосНИОРХ, 2008. С. 20-22.
5. **Chukova E.I.**, Gordeeva N.V., Oleinik A.G. Microsatellite genetic variation of Asian populations of Dolly Varden charr // 6th International Charr Symposium 15th-18th June 2009, Stirling, Scotland: Abstracts of Poster Presentations. Stirling, Scotland, 2009. P. 4.
6. **Чукова Е.И.**, Олейник А.Г., Скурихина Л.А. Действие случайного дрейфа генов в изолированных популяциях гольцов рода *Salvelinus* // V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Москва, 21-28 июня 2009 г.: Тезисы докладов. М., 2009. Ч. 2. С. 196.

Бондарь Евгения Игоревна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПРИРОДНЫХ ИЗОЛИРОВАННЫХ
ПОПУЛЯЦИЯХ ГОЛЬЦОВ РОДА *SALVELINUS***

03.02.07 – генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук