

*На правах рукописи*

**ОЛЕЙНИК**  
**Алла Геннадьевна**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ГОЛЬЦОВ РОДА *SALVELINUS*:  
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Владивосток – 2013

Работа выполнена в лаборатории генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

**Официальные оппоненты:**

**Картавец Юрий Федорович**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией молекулярной систематики

**Малярчук Борис Аркадьевич**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией генетики

**Челомина Галина Николаевна**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, главный научный сотрудник

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

Защита диссертации состоится «28» июня 2013 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690059, Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17). Факс: (423)2310-900, электронный адрес: inmarbio@mail.primorye.ru

Отзывы просим присылать на e-mail: [mvaschenko@mail.ru](mailto:mvaschenko@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

Автореферат разослан « » марта 2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

*Ващенко*

М.А. Ващенко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одним из направлений развития современной теории видообразования является обнаружение связи между фенотипической дифференциацией популяций, рас, подвидов и видов с определенными генетическими изменениями (Левонтин, 1978). Традиционно эволюционная динамика преобразований генотипов и фенотипов описывается в рамках разных разделов эволюционной генетики и на основе разной методологии. Если цели филогенетики сосредоточены в области макроэволюции и касаются выяснения родственных отношений между видами и таксономическими группами, то филогеография в основном концентрируется на анализе микроэволюционных закономерностей на внутривидовом уровне. В то же время, данные научные направления можно рассматривать как части одного непрерывного процесса описания структуры биоразнообразия, при помощи которого определяются границы видов и реконструируются родственные отношения между филогенетическими группами разного ранга.

Филогеография сформировалась в результате синтеза эволюционной, популяционной и молекулярной генетики (Avice et al., 1987; Avice, 1998, 2000). Часто термин ‘филогеография’ интерпретируют как средство филогенетического анализа данных в контексте географического распространения организмов. Но область исследования, которую представляет филогеография, значительно шире. Отталкиваясь от работ Ф. Добжанского (Dobzhansky, 1937) и Э. Майра (Майр, 1968), Дж. Эйвис предполагал глубокие эволюционные перспективы филогеографического анализа, считая, что он может стать своеобразным мостом между систематикой и популяционной генетикой (Avice, 2000). Кроме того, понимание микроэволюционных процессов, действующих внутри видов, “можно экстраполировать на объяснение макроэволюционных различий между видами и высшими таксонами” (Avice et al., 1987, p. 489). В этом контексте филогеография является частью филогенетического анализа для тестирования гипотез о родственных отношениях, распределении видов и механизмах видообразования, и такая интеграция имеет большое будущее (Hickerson et al., 2010).

Гольцов рода *Salvelinus* (Salmoniformes: Salmonidae) можно рассматривать как модельную группу для анализа многих эволюционных проблем (Викторовский, 1978; Савваитова, 1989; Глубоковский, 1995; Taylor, 1999, 2004; Schaffer, 2004; Stearns, Hendry, 2004). Высокая экологическая пластичность гольцов позволяет им осваивать самые разнообразные биотопы, что, с одной стороны, порождает значительную морфоэкологическую изменчивость на обширном ареале, а с другой, создает предпосылки для образования различных популяционных систем, представляющих богатый материал для изучения процессов микроэволюции, возникновения биоразнообразия на видовом и внутривидовом уровнях.

Родственные отношения, происхождение и возможные пути эволюции гольцов рода *Salvelinus* широко обсуждаются (Гриценко, 1975; Balon, 1980, 1984; Behnke, 1980, 1984, 1989; Cavender, 1980, 1984; Savvaitova, 1980, 1995; Kendall, Behnke, 1984; Савваитова, 1989; Cavender, Kimura, 1989; Stearley, 1992; Stearley, Smith, 1993; Глубоковский, 1995; и др.). Тем не менее, несмотря на хорошую морфологическую изученность, многие вопросы систематики и филогении рода остаются невыясненными. В этой связи, молекулярно-генетические исследования гольцов, несомненно, представляют интерес, так как позволяют определять генетические различия между популяциями, находящимися на

разных уровнях фенотипической дивергенции и, таким образом, способствуют установлению иерархии родственных связей таксонов, их взаимной обособленности, времени возникновения, степени дивергенции от общего предка рода. При этом особое значение приобретают исследования гольцов в местах их симпатрического обитания.

Перспективы решения филогенетических проблем в молодых, близкородственных группах, к которым относятся и гольцы рода *Salvelinus*, связаны с использованием анализа митохондриального генома. Выбор митохондриальной ДНК (мтДНК) животных в качестве молекулярного маркера был обусловлен предполагаемой селективной нейтральностью (William et al., 1985), гаплоидностью, отсутствием рекомбинаций (Hayashi et al., 1985), малым эффективным размером популяций (Nei, Tajima, 1981), относительно высокой скоростью эволюции, по сравнению с уникальными последовательностями ядерного генома (Brown et al., 1982; Moritz et al., 1987). Особенности наследования мтДНК, в отсутствие потока генов, приводят к быстрой дивергенции предковых популяций, вследствие короткого времени достижения реципрокной монофилии (Avice, 2000). Интеграция филогенетических и филогеографических подходов позволяет реконструировать последовательности возникновения таксонов и внутривидовых групп, а также оценивать роль исторических событий в формировании внутривидовой дифференциации и межвидовой дивергенции.

Среди биологических проблем, заслуживающих специального рассмотрения, одна из наиболее важных – влияние качественного состава признаков на результаты филогенетических реконструкций. Содержание данной проблемы включает два основных вопроса, касающихся репрезентативности исследуемой ограниченной выборки генетических признаков в отношении всего генома, и соответствия между эволюцией отдельных генов и эволюцией видов. Данные вопросы взаимосвязаны, так как в качестве объектов обычно выступают не группы организмов или таксоны, а отдельные структуры (белки, гены, нуклеотидные последовательности и т.д.), представленные определенным набором признаков. Однако в качестве элементарной единицы сравнения в итоговых гипотезах рассматривается, как правило, один таксон (вид, род и т.д.). Это приводит к серьезным противоречиям при филогенетической интерпретации результатов, так как дивергенция гомологичных генов не всегда отражает филогенетические отношения между видами (Pamilo, Nei, 1988; Avice, 1989). В результате может возникнуть ситуация, когда на основании корректной (в отношении сравниваемых генов) филограммы, может быть сформулирована некорректная (в отношении исследуемой монофилетической группы таксонов) филогенетическая гипотеза. В настоящее время исследователи пришли к пониманию того, что следует проводить разграничение между “деревьями видов” и “деревьями генов” (Avice et al., 1983; Pamilo, Nei, 1988; Wu, 1991; Doyle, 1992; Maddison, 1997; Slowinski, Page, 1999; Nei, Kumar, 2000; Nichols, 2001).

Только для некоторых групп, эволюционные характеристики геномов которых хорошо изучены (Cornelli, Ward, 2000; Arnason et al., 2002; Ishiguro et al., 2003; Roques et al., 2006; Kawahara et al., 2009), выбор генетических маркеров для филогенетического анализа не составляет проблемы. Но для большинства менее изученных таксономических групп (в том числе лососевых рыб) такая информация, несмотря на явный прогресс, наблюдаемый в последнее десятилетие, все же ограничена. Поэтому следует оценивать возможности выявления филогенетического сигнала, так как анализ разных индивидуальных генов часто приводит к

филогенетическим реконструкциям с существенно различающимися топологиями (Hillis, Dixon, 1991; Russo et al., 1996; Zardoya, Meyer, 1996; Cornelli, Ward, 2000; Miya et al., 2001; Олейник 1994; Rokas et al., 2002, 2003).

**Цель и задачи исследования.** Основная цель исследования заключается в разработке фундаментальных вопросов реконструкции филогении гольцов рода *Salvelinus*, и установлении особенностей эволюции митохондриального генома данной филогенетической группы.

**В работе решались следующие задачи:**

1. Определить основные черты популяционно-генетической и филогеографической структурированности двух таксонов гольцов, исторически заселяющих районы, испытавшие значительное ледниковое воздействие и не подвергавшиеся оледенению. Оценить филогеографическое соответствие генеалогических деревьев гаплотипов мтДНК, построенных для видов лососевых рыб, занимающих общий исторический ареал.

2. Предложить наиболее вероятные эволюционные модели формирования нескольких современных зон симпатрии гольцов на основе статистических оценок подразделенности полиморфизма мтДНК и анализа генеалогий гаплотипов мтДНК.

3. Оценить роль исторических событий в формировании внутривидовой дифференциации и межвидовой дивергенции гольцов рода *Salvelinus*.

4. Реконструировать филогению мтДНК гольцов рода *Salvelinus* и сформулировать гипотезу о последовательности филогенетических событий и структуре родственных отношений в рамках анализа генетического сходства по филогенетически информативным признакам.

5. Рассмотреть влияние начальных условий описания таксонов на итоговые филогенетические реконструкции для двух родов лососевых рыб (*Oncorhynchus* и *Salvelinus*), оценить применение мтДНК как молекулярного филогенетического маркера для лососевых рыб.

6. На основе синтеза молекулярно-генетических, кариологических и морфологических данных проанализировать существующие взгляды на систему родственных отношений гольцов рода *Salvelinus*, уточняя при необходимости границы видов.

**Научная новизна работы.** Впервые определены возможности выявления филогенетического сигнала для разных участков мтДНК и установлены гены, несущие максимальную информацию о филогенезе лососевых рыб.

Разработан оригинальный комплекс молекулярно-генетических маркеров, объединяющий несколько участков мтДНК, для анализа филогенетических отношений и филогеографических связей гольцов рода *Salvelinus*.

На основе синтеза собственных и литературных данных пересмотрены филогенетические отношения гольцов рода *Salvelinus*. Уточнен состав монофилетических групп гольцов. Впервые получены доказательства полифилетичности не только арктического гольца *S. alpinus*, но и мальмы *S. malma*, которые объединяют таксоны, дивергировавшие в разное время и от разных предковых митохондриальных линий.

Выявлены филогеографические закономерности формирования и расселения монофилетических групп гольцов. Показано, что одним из центров видообразования рода *Salvelinus* являются Японское море и южная часть Охотского моря.

Обоснованы наиболее вероятные эволюционные модели формирования нескольких симпатрических популяций гольцов северо-восточной Азии, опирающиеся на гипотезу аллопатрического видообразования.

Предложена дисперсалистская модель изоляции и реколонизации из аллопатрических рефугиумов, объясняющая внутривидовую дифференциацию у двух таксонов гольцов – *Salvelinus malma malma* и *Salvelinus malma krascheninnikovi*.

**В ходе исследования многие данные получены впервые.** Проведен анализ рестрикционного полиморфизма нескольких эндемичных популяций гольцов (Олейник и др., 2003, 2004, 2007, 2010; Олейник, Скурихина, 2007; Oleinik, Skurikhina, 2010). Получены генетические доказательства близости гольца Леванидова к общему предку рода (Олейник, Скурихина, 1999; Олейник и др., 2003). Выявлена подразделенность гаплотипов мтДНК на три филогенетические группы, географическое распределение которых соответствует трем подвидам мальмы - *S. m. malma*, *S. m. krascheninnikovi* и *S. m. lordi* (Олейник и др., 2005). Установлено, что уровень дивергенции нуклеотидных последовательностей мтДНК между подвидами мальмы соответствует различиям между валидными видами гольцов (Олейник и др., 2001, 2002; Oleinik et al., 2004). На основе анализа мтДНК сформулирована гипотеза о более древнем происхождении *S. m. krascheninnikovi* (Олейник и др., 2001, 2002). Показана генетическая идентичность *S. m. malma* Азии и Северной Америки (Олейник и др., 2005, 2010). Получены данные о вероятной исторической интрогрессивной гибридизации между *S. m. malma* и *S. m. krascheninnikovi* (Олейник и др., 2002).

**Теоретическое и практическое значение работы.** После введения государствами двухсотмильной экономической зоны лосося являются национальным достоянием той страны, где происходит их воспроизводство. В связи с этим, большое значение приобретает не просто изучение морфологической и генетической изменчивости в рамках отдельного вида, но и понимание эволюционной истории лососевых рыб. Проведенное исследование указывает на перспективность объединения филогеографического и филогенетического подходов для решения сложных проблем филогении относительно недавно дивергировавших таксонов лососевых рыб. Полученные данные по филогении и филогеографии гольцов рода *Salvelinus* могут быть полезны при проведении сравнительных исследований, касающихся проблем видообразования и исторической биогеографии ихтиофауны Северной Пацифики. Разработана и апробирована система молекулярных маркеров мтДНК, позволяющая дифференцировать симпатричные популяции, идентифицировать узкоареальные эндемичные таксоны и эволюционно значимые внутривидовые группировки гольцов. Применение адекватных молекулярно-генетических маркеров необходимо для оценки и мониторинга биологического разнообразия, а также предложения природоохранных мер в условиях усиливающегося антропогенного воздействия на популяционные системы промысловых рыб, к которым относятся гольцы рода *Salvelinus*.

Полученные в ходе работы результаты используются при проведении спецкурса “Основы современной филогенетики” в Дальневосточном федеральном университете (ДФУ).

**Апробация работы.** Основные положения работы были представлены и обсуждались на *всесоюзном совещании “Систематика, биология и биотехника разведения лососевидных рыб”* (Санкт-Петербург, 1994), *первом конгрессе ихтиологов России* (Астрахань, 1997), *всероссийской конференции к 100-летию*

Государственного Дарвиновского музея “Современные проблемы биологической эволюции” (Москва, 2007), V съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященного 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина (Москва, 2009); *международных конференциях*: “Bridges of science between North America and Russian Far East” (Vladivostok, 1994), “Biology and Evolution of Charrs of the Northern Hemisphere” (Kamchatka, Russia, 1998), “Bridges of Science between North America and the Russian Far East: Past, Present, and Future” (Vladivostok, 2004), “Computational Phylogenetics and Molecular Systematics commemorating the 50th anniversary of Molecular Phylogenetics and Systematics in Russia” (Moscow, 2007), “Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб” (Санкт-Петербург, 2008), “Problems of Population and General Genetics” (Moscow, 2011); *международных симпозиумах*: the 6<sup>th</sup> International Charr Symposium (Stirling, Scotland, 2009); the 7<sup>th</sup> International Charr Symposium (Yuzhno-Sakhalinsk, 2012), а также обсуждались на *ежегодных научных конференциях* ИБМ ДВО РАН в период с 1992 по 2009 гг.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Митохондриальная ДНК является эффективным молекулярным маркером для реконструкции филогенетических отношений между видами и филогенетическими группами, анализа микроэволюционных процессов (дивергенция, дифференциация, историческая демография популяций) на внутривидовом уровне, при условии использования репрезентативного комплекса признаков для описания структуры анализируемого биоразнообразия лососевых рыб семейства Salmonidae.

2. Гольцы рода *Salvelinus* представляют монофилетическую группу лососевых рыб. Спецификой рода *Salvelinus* является существование двух групп таксонов, с филогенетическими проблемами разной степени сложности. Поэтому общую топологию дендрограмм рода *Salvelinus* следует охарактеризовать как сложную, с длинными внешними и короткими внутренними ветвями, неустойчивую к эффекту притяжения длинных ветвей при филогенетических реконструкциях.

3. Процессы видообразования гольцов рода *Salvelinus* преимущественно определялись глобальными климатическими и географическими изменениями в позднем кайнозое. В филогенезе рода прошло четыре цикла дивергенции. Первый этап филогенеза связан с последовательной дивергенцией базальных ветвей (*S. fontinalis*, *S. namaycush*, *S. levanidovi* и *S. leucomaenis*). Позже произошло обособление линии *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*) и последующее разделение общего предка рода на два митохондриальных филума, дивергенция которых привела к образованию четырех монофилетических групп: арктической, западной тихоокеанской, берингийской и группы *S. alpinus*. На последнем этапе проходила диверсификация внутри филогенетических групп.

4. Дисперсалистская модель расселения из аллопатрических рефугиумов объясняет внутривидовую дифференциацию у двух таксонов гольцов (*S. m. malma* и *S. m. krascheninnikovi*), исторические ареалы которых располагались на территориях, испытавших ледниковое воздействие и не подвергавшихся оледенению в позднем кайнозое. Особенности популяционной дифференциации *S. m. malma* обусловлены событиями, сопровождавшими смену периодов оледенений и межледниковья в плейстоцене. В то же время, самостоятельная дивергенция *S. m. krascheninnikovi* связана с циклическими процессами геологического формирования бассейна Японского моря и прилегающих территорий.

5. В пределах географического региона северо-восточной Азии для гольцов рода *Salvelinus* обосновано существование двух эволюционных моделей формирования

исследованных бимодальных зон симпатрии, опирающихся на гипотезу аллопатрического видообразования. Присутствие симпатрических популяций связано с вторичным контактом предков значительно дивергировавших филетических линий и множественными вселениями представителей близкородственных филетических линий, дивергировавших в разных рефугиумах.

6. Современная систематика рода *Salvelinus*, объединяющая в рамках полнокомплексного вида *Salvelinus alpinus* – *Salvelinus malma* complex большую часть таксонов гольцов, вероятно, не полностью отражает филогенетические взаимоотношения, поскольку основана на гомопластичных морфологических и экологических признаках. Альтернативой объединения в полнокомплексный вид является переосмысление содержания таксонов и разделения их на несколько видов, соответствующих монофилетическим группам.

**Публикации результатов работы.** По теме диссертации опубликовано 42 научных работы, из них 25 статей, в числе которых 24 в журналах, включенных в “Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук”.

**Личный вклад автора.** Автор принимал непосредственное участие на всех этапах исследования, кроме сбора материала. Экспериментальная работа (PCR-RFLP анализ мтДНК), расчет молекулярной массы рестрикционных фрагментов и картирование амплифицированных участков мтДНК выполнены совместно с Л.А. Скурихиной (лаборатория генетики, ИБМ ДВО РАН).

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, 7 глав, выводов, списка литературы и приложений. Основное содержание работы изложено на 532 страницах печатного текста, иллюстрировано 52 рисунками, 40 таблицами, и дополнено 9 приложениями. Список литературы содержит 1063 цитируемых работ.

Исследование осуществлено при финансовой поддержке Программ Президиума РАН (проекты 04-1-П10-012, 06-1-П10-015, 06-1-П11-025), грантов РФФИ-ДВО РАН (№ 06-1-П11-021), ДВО РАН (№ 03-3-Е-06-031, № 04-3-Е-06-021, № 05-III-А-06-133, № 09-1-П23-03) и Международного научного фонда (№ NOF000, № NOF300). Ряд исследований был проведен на средства государственной научно-технической программы “Приоритетные направления генетики”, а также грантов РФФИ (№ 94-04-11129, № 96-04-63010к, № 98-04-48919, № 00-04-63057, № 01-04-49436, № 02-04-49480, № 04-1-06-006).

**Благодарности.** Считаю своим долгом выразить признательность первым научным руководителям, кандидату биологических наук Г.П. Манченко и доктору биологических наук, профессору М.К. Глубоковскому, оказавшим влияние на формирование научного мировоззрения и становление автора как самостоятельного исследователя.

Автор глубоко признателен Сергею Владимировичу Фролову (ИБМ ДВО РАН) и Игорю Александровичу Черешневу (ИБПС ДВО РАН) за многолетнее совместное сотрудничество по исследованию гольцов рода *Salvelinus*, включающее сбор, таксономическое определение и заинтересованное обсуждение полученных результатов. Автор выражает сердечную благодарность своему соавтору и единомышленнику Любови Андреевне Скурихиной, заведующему лабораторией генетики ИБМ ДВО РАН Владимиру Алексеевичу Брыкову, принимавшему активное участие в развитии исследований гольцов, коллективу лаборатории генетики – Н.Е.



Поляковой, А.Д. Кухлевскому, Ю.Ф. Картавцеву, А.И. Пудовкину, Н.И. Заславской, Т.Ф. Прийме, Е.И. Бондарь, Е.С. Балакиреву, О.В. Апаликовой, Н.Л. Коваленко, а также сотрудникам ИБМ ДВО РАН А.В. Молодиченко, И.И. Деридовичу, Л.Г. Ерофеевой за моральную поддержку, советы и всестороннюю помощь при проведении исследований и анализе полученных данных.

Автор искренне благодарен за участие в формировании коллекции препаратов ДНК лососевых рыб С. Абе, Вл.А. Брыкову, В.А. Брыкову, Р.М. Викторовскому, Дж. Венбургу, А. Гарретту, М.К. Глубоковскому, Е.В. Голубь, П.К. Гудкову, А. Гото, М.Ю. Засыпкину, Е.В. Иванковой, П. Крэйн, Т.В. Малининой, А.П. Никанорову, С.Д. Олейник, В.Т. Омельченко, В.А. Паренскому, Е.Г. Погодаеву, М.Ю. Репину, И.Г. Рыбниковой, Н.С. Романову, И.Н. Рязановой, С.Н. Сафронову, Э. Тейлору, И.В. Тиллеру, С.В. Фролову, И.А. Черешневу, Н.Ю. Шпигальской, А. Элц, сотрудникам биологических станций “Сокол” и ”Радуга” (ИБМ ДВО РАН), Дальнеозерской и Паратункинской биологических станций (КамчатНИРО) и Кроноцкого государственного биосферного заповедника, без помощи которых данное исследование было бы невозможно.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. НАЧАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ОПИСАНИЯ ТАКСОНОВ В ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ: ПРОБЛЕМЫ И СТРАТЕГИЯ

Филогенетика – это раздел эволюционной биологии, изучающий филогенез, рассматриваемый как процесс появления новых или исчезновения существующих групп организмов, и структуру родственных отношений между филогенетическими группами разного ранга. Основная цель филогенетического анализа сконцентрирована в понятии филогенетической реконструкции, которая обозначает, с одной стороны, процесс исследования, с другой, итоговую гипотезу о родственных взаимоотношениях конкретных филогенетических групп. Классическая филогенетика, фенетика и кладизм, представляющие направления современной филогенетики, опираются на разные методологии и предлагают разные методические подходы для реконструкции филогенетических отношений. Автор поддерживает позицию исследователей, настаивающих на необходимости создания единой методологии филогенетических реконструкций на основе синтеза наиболее эффективных принципов классической филогенетики, фенетики и кладизма (Майр, 1971; Sneath, Sokal, 1973; Глубоковский, 1995; Поздняков, 1976; Павлинов, 2005).

**1.1. Проблемы филогенетических реконструкций.** В разделе охарактеризованы основные этапы филогенетического анализа. Дан критический обзор современных представлений о стратегии формирования эффективной таксономической выборки для филогенетического анализа. Особое внимание уделено методам реконструкции филогенетических деревьев. Подводя итог обсуждению, отмечается, что для оценки филогенетических отношений между таксонами и уровня достоверности топологий дендрограмм следует опираться на несколько методов, так как используемый для описания структуры генетического разнообразия набор признаков не обязательно удовлетворяет требованиям и условиям эффективной работы каждого отдельного статистического метода.

**1.2. Общее представление о гольцах рода *Salvelinus* как модельной группе для филогенетического анализа.** Гольцы рода *Salvelinus* относятся к лососевым рыбам семейства Salmonidae, которые традиционно используются для изучения

процессов микро- и макроэволюции. Поэтому филогенетические исследования лососевых рыб методически можно рассматривать как анализ хорошо поддержанной филогении (“*well-established phylogenies*”) (согласно: Yang, 2006). Такой подход повышает надежность филогенетической гипотезы, поскольку есть возможность сопоставить полученные молекулярно-генетические реконструкции с имеющимися данными.

На основе анализа различных взглядов на родственные связи высших таксонов лососевых рыб (Oakley, Phillips, 1999; Buisine et al., 2002; Crespi, Fulton, 2004; Осинов, Лебедев, 2004; Олейник, Скурихина, 2008), обосновано рассмотрение представителей рода *Salmo* в качестве внешней группы для реконструкции кладогенеза и филогенеза гольцов рода *Salvelinus*.

**Таксономический состав рода *Salvelinus*** уже продолжительное время представляет тему для обсуждения и дискуссий (Берг, 1948; McPhail, 1961; Глубоковский и др., 1979; Behnke, 1980, 1989; Савваитова, 1989; Nelson, 1994, 2006; и др.). Непрерывающиеся дебаты вокруг корректной таксономии гольцовых рыб определяются высоким морфоэкологическим разнообразием, которое проявляется на фоне огромного ареала. Сочетание этих двух факторов делает гольцов особенно сложной таксономической группой. Показательно, что таксономические проблемы существуют на нескольких иерархических уровнях внутри рода *Salvelinus*: выделение подродов, число современных видов, а также состав подвидовых таксонов. В результате, если одни исследователи поддерживают описание у гольцов большого числа валидных видов (Берг, 1948; Викторовский, 1978; Глубоковский, 1995; Kottelat, 1997; Фролов, 2000; Черешнев и др., 2002; Богущая, Насека, 2004; Oleinik et al., 2007; и др.), то другие – обосновывают деление рода на ограниченное количество видов, часть из которых являются полнокомплексными (Behnke, 1980, 1989; Савваитова, 1989; Nelson, 1994, 2006; Savvaitova, 1995; Решетников, 2003; и др.). Дан критический обзор представлений, объединяющих все аллопатрические и симпатрические популяции, формы, виды гольцов, кроме *S. namaycush*, *S. fontinalis* и *S. leucomaenis*, в рамках полнокомплексного вида *S. alpinus* complex с группировками разного иерархического уровня.

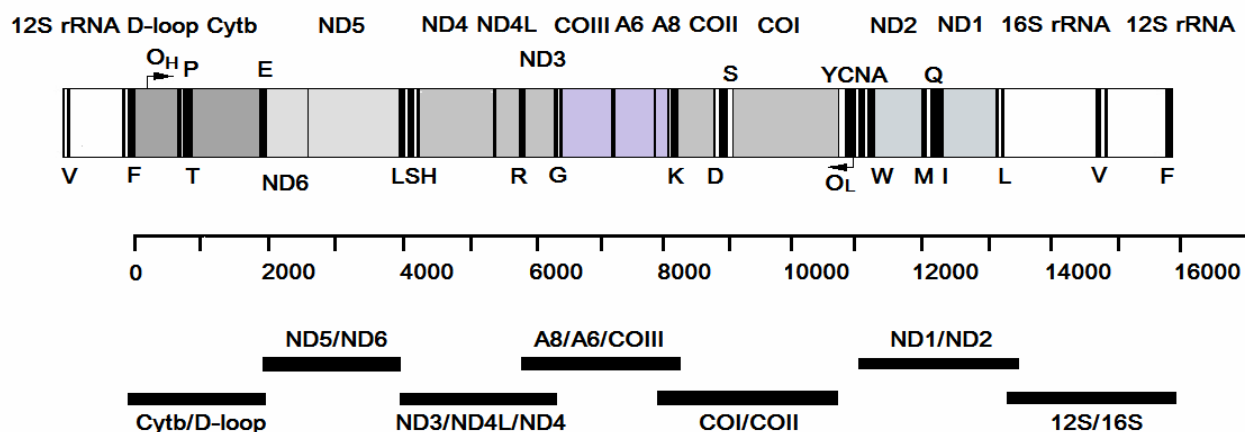
## Глава 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

**2.1. Основные свойства мтДНК, как генетического маркера типа I.** В разделе описываются структура, функции и особенности наследования мтДНК, существенные для филогенетических и филогеографических исследований, а также общая характеристика методов анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов мтДНК. В заключение подчеркивается, что метод PCR-RFLP анализа мтДНК обладает достаточной разрешающей способностью при реконструкции родственных отношений недавно дивергировавших, молодых филогенетических групп (Wilson et al., 1985; Moritz et al., 1987; Avise, 2004), к которым относятся гольцы рода *Salvelinus*.

**2.2. Методы исследования. Общая схема лабораторного протокола анализа мтДНК** включает несколько последовательных стадий: стандартные процедуры выделения ДНК (Sambrook et al., 1989), амплификации мтДНК в полимеразной цепной реакции (PCR), анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP) мтДНК, формирования таксон-признаковых матриц.

Фрагменты мтДНК амплифицировали в полимеразной цепной реакции на тотальной геномной ДНК с использованием набора олигонуклеотидных праймеров, предложенных для лососей *Oncorhynchus mykiss* и *Oncorhynchus kisutch* (Gharrett et al.,

2001). В настоящей работе были амплифицированы шесть фрагментов (*ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*, *ND3/ND4L/ND4*, *A8/A6/COIII*, *COI/COII*), составляющие около 80% митохондриального генома (рис. 1). Отсутствие данных для участка *12S/16S* не может привести к сколько-нибудь значимому смещению конечных результатов, так как, согласно сравнительному анализу 67 полностью секвенированных митохондриальных геномов шести видов лососевидных рыб (Wilhelm et al., 2003), в этой группе рибосомальные гены являются высококонсервативными.



**Рис. 1.** Линейная генная карта мтДНК (по: Zardoya et al., 1995). Расположение семи участков мтДНК относительно карты митохондриального генома позвоночных соответствует опубликованным схемам (Gharrett et al., 2001).

Цели и задачи конкретных исследований определили состав анализируемых фрагментов мтДНК. Предварительный сравнительный анализ позволил выявить наиболее изменчивые участки в геноме гольцов (*ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*), которые в дальнейшем использовались: 1) для популяционного и филогеографического анализов; 2) для дифференциации симпатричных популяций, относящихся к значительно дивергировавшим филогенетическим линиям. Анализ изменчивости по шести амплифицированным фрагментам мтДНК применялся: 1) для реконструкции филогений; 2) тестирования влияния начальных условий описания таксонов на результаты реконструкций; 3) дифференциации симпатричных популяций, принадлежащих к близкородственным филогенетическим линиям.

В соответствии с задачами исследований, для анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, амплифицированных в PCR участков мтДНК, использовались разные наборы из двадцати рестрикционных эндонуклеаз (“MBI Fermentas”, Литва; “СибЭнзим”, Россия): *Asu I*, *Ava I*, *Ava II*, *BstN I*, *BstU I*, *Dde I*, *EcoR V*, *Hha I*, *Hinf I*, *Mbo I*, *Mbo II*, *Msp I*, *Rsa I*, *Sty I*, *BsuR I*, *Vsp I*, *Bcl I*, *Ssp I*, *Bme 1390I*, *Taq I*.

Результаты RFLP анализа трансформировались в таксон-признаковую матрицу таким образом, что в качестве признаков выступали рестрикционные сайты, уникальное сочетание которых определяет структуру гаплотипа мтДНК. Состояние сайта, присутствие (1) или отсутствие (0), устанавливалось в процессе картирования амплифицированных участков мтДНК по набору рестрикционных фрагментов. Данные анализа каждой особи по всем сайтам и всем участкам объединяли, получая, таким образом, комбинированные гаплотипы (в дальнейшем – гаплотипы).

**Статистическая обработка данных PCR-RFLP анализа мтДНК** включает:

- популяционно-генетический анализ на основе стандартных показателей внутривидового полиморфизма и дивергенции мтДНК (Nei, Tajima, 1981, 1983; Nei, 1987; Tajima, 1983);
- количественная оценка географической подразделенности изменчивости мтДНК на основе иерархического анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) и метода Монте-Карло (Roff, Bentzen, 1989);
- анализ демографических параметров популяций по распределению показателей различий между всеми парами гаплотипов (*mismatch distribution*) (Rodgers, Harpending, 1992; Harpending, 1994), тестов *D* (Tajima, 1989) и *F<sub>s</sub>* (Fu, 1997);
- генеалогический анализ гаплотипов методами медианных сетей (алгоритм MJ) (Bandelt et al., 1999) и минимальной протяженности (алгоритм MST) (Excoffier, Smouse, 1994);
- гнездовой кладистический филогеографический анализ (NCPA) (Templeton et al., 1987, 1995); для интерпретации результатов использовался модифицированный ключ, разработанный А. Темплетоном (Templeton, 1998);
- филогенетический анализ на основе комплексного подхода, объединяющего фенетический анализ генетического сходства по всему массиву признаков, филогенетический анализ родственных отношений, кладистический анализ филогенетически информативных признаков, тестирование устойчивости связей при изменении количества и качества дифференцирующих признаков, состава терминальных групп. Топологию дендрограмм определяли по следующим алгоритмам: 1) дистанционные методы, основанные на кластер-анализе: невзвешенного попарного сравнения с арифметическим усреднением UPGMA (Sneath, Sokal, 1973), “ближайшего связывания” NJ (Saitou, Nei, 1987); 2) поисковые методы, применяющие разные стратегии для выбора оптимальной топологии: максимальной парсимонии MP (Hendy, Penny, 1982; Swofford et al., 1996), максимального правдоподобия ML (Felsenstein, 1981), Байесовский метод максимального правдоподобия BI (Rannala, Yang 1996; Mau, Newton 1997);
- достоверность топологии дендрограмм оценивалась бутстрэпом (Felsenstein, 1985), который включал 1000 итераций для каждого набора данных; устойчивость точек ветвления оценивалась по значениям бутстрэп-поддержек (*BS*), а также апостериорных вероятностей (*PP*) для BI-деревьев.

Математический анализ данных проводили, используя пакеты программ: ARLEQUIN version 2.000 (Schneider et al., 2000) и version 3.5.1.3 (Excoffier, Lischer, 2010); CHIRXC (Zaykin, Pudovkin, 1993); GeoDis (Posada et al., 2000); MRBAYES version 3.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003); NETWORK 4.6.10 (“Fluxus Technology Ltd”., [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)); NTSYS-pc 21 (Rohlf, 1990); PAUP version 4.0b10 (Swofford, 2002); PHYLIP 3.67 (Felsenstein, 1989, 2004); REAP (McElroy et al., 1992); TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

**2.3. Объекты исследования – лососевые рыбы семейства Salmonidae.** Работа основана на оригинальном материале из коллекции ДНК лососевых рыб семейства Salmonidae лаборатории генетики ИБМ ДВО РАН, собранного в период с 1995 по 2005 годы. Основными объектами исследования стали гольцы рода *Salvelinus*: белый голец *S. albus* (58 экз.), арктический голец *S. alpinus alpinus* (49 экз.) и *S. a. oquassa* (22 экз.), чукотский голец *S. andriashevi* (2 экз.), бычья форель *S. confluentus* (5 экз.), голец Крогиус *S. krogiusae* (5 экз.), длинноголовый голец *S. kronocius* (36 экз.), кунджа *S. leucomaenis* (13 экз.), голец Леванидова *S. levanidovi* (13 экз.), северная мальма *S.*

*malma malma* (436 экз.), южная азиатская мальма *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*) (213 экз.), южная североамериканская мальма *S. m. lordi* (14 экз.), носатый голец *S. schmidtii* (44 экз.), голец Таранца *S. taranetzi* (27 экз.), начикийский голец *Salvelinus* sp. 4 (17 экз.). Для выполнения поставленных задач в анализ были включены представители родов *Salmo*: атлантический лосось *Salmo salar* (3 экз.); *Oncorhynchus*: кета *O. keta* (10 экз.), горбуша *O. gorbuscha* (10 экз.), сима *O. masou* (10 экз.), нерка *O. nerka* (10 экз.), кижуч *O. kisutch* (10 экз.), чавыча *O. tshawytscha* (10 экз.); *Parasalmo*: микижа *P. mykiss* (или *Oncorhynchus mykiss*) (33 экз.).

Общая численность препаратов мтДНК составила 1105, из которых 1012 препаратов мтДНК гольцов были использованы для филогенетического анализа. В популяционный и филогеографический анализы были включены 436 препаратов мтДНК *S. m. malma* (27 выборок) и 213 – *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*) (13 выборок).

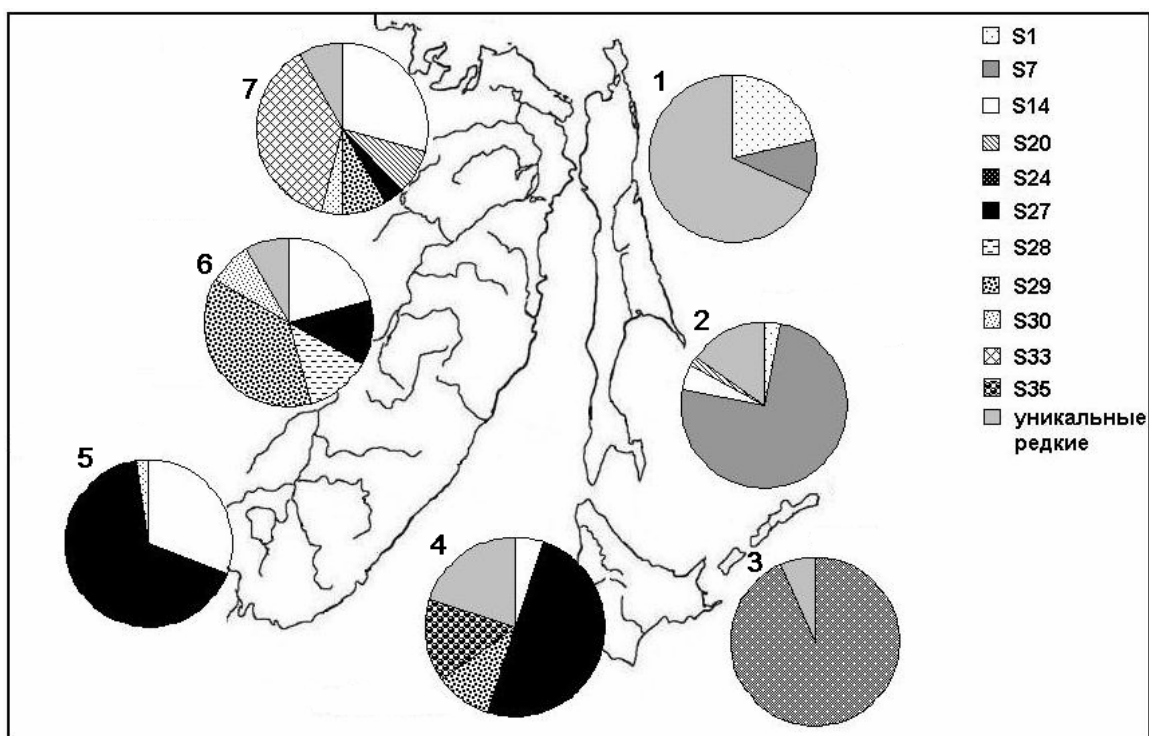
### Глава 3. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ГОЛЬЦОВ РОДА *SALVELINUS*

**3.1. Филогеографические представления о формировании генетической подразделенности популяций.** Одной из основных задач популяционной генетики является исследование микроэволюционных процессов, связанных с распределением генетической изменчивости внутри и между популяциями, дивергенцией популяций и, в конечном счете, этапами формо- и видообразования. В последние годы наибольшие успехи в этой области обусловлены развитием филогеографического подхода, объединяющего данные о внутривидовой дифференциации и географическом распределении гаплотипов мтДНК (Avice et al., 1987; Avice, 2000, 2009).

В рамках популяционно-генетического анализа предметом филогеографии является определение особенностей наблюдаемого распространения гаплотипов мтДНК на пространственной шкале и объяснение причин его формирования (Avice, 2000). Было показано, что пережитые популяциями отдельных видов демографические процессы отражаются в структуре генеалогических деревьев гаплотипов и часто являются причиной генетической подразделенности многих современных таксонов (Avice et al., 1998). Поскольку глобальные палеогеографические процессы, происходившие в плиоценовую и плейстоценовую эпохи, оказали серьезное воздействие на формирование биоразнообразия не только арктических, но и всех северных экосистем (Черешнев, 1996; Hewitt, 2000, 2004), особый интерес представляет исследование филогеографии мальмы *Salvelinus malma* (Walbaum), эволюция которой, благодаря исключительной морфологической и экологической пластичности, сопровождалась интенсивными процессами формообразования. Согласно Р. Бенке (Behnke, 1984), у мальмы выделяется три подвида: северная мальма *Salvelinus malma malma* Walbaum, южная азиатская мальма *Salvelinus malma krascheninnikovi* Taranetz и южная североамериканская мальма *Salvelinus malma lordi* Günter. Учитывая уровень дивергенции (Олейник и др., 2005; Oleinik et al., 2004; 2007), филогеография *S. m. malma* и *S. m. krascheninnikovi* в диссертации анализируется отдельно.

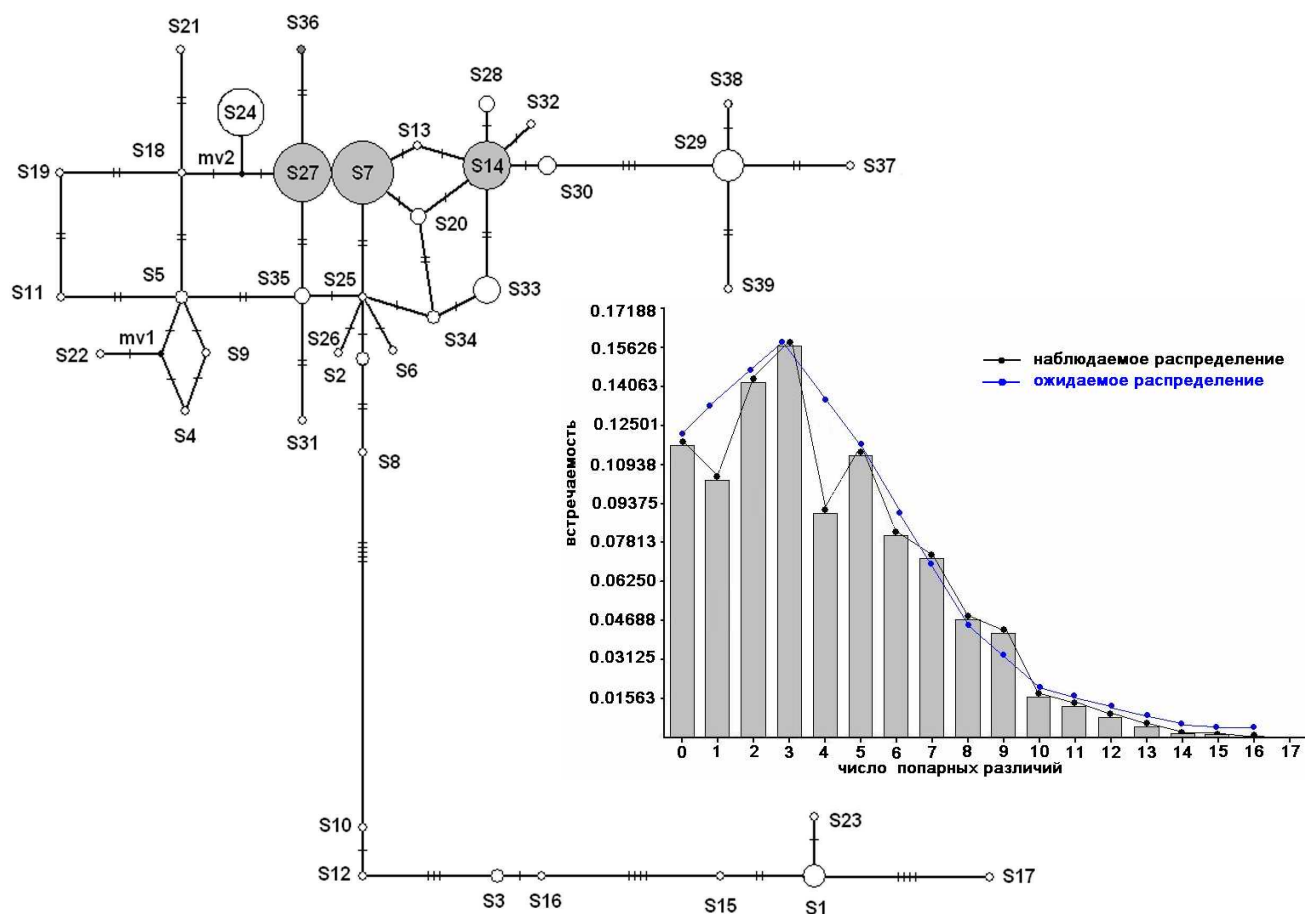
**3.2. Филогеография южной азиатской мальмы *Salvelinus malma krascheninnikovi*.** Исследование филогеографии южной азиатской мальмы *S. m. krascheninnikovi* основано на оригинальном материале (рис. 2), представляющем большую часть ареала: о. Сахалин, Курильские острова, материковое побережье

Японского моря и о. Хоккайдо (Олейник и др., 2001, 2002, 2004, 2007, 2010). Обобщая результаты PCR-RFLP анализа изменчивости мтДНК и литературные данные, определены следующие особенности популяционно-генетической структуры *S. t. krascheninnikovi*. Во-первых, высокое разнообразие внутри (52% молекулярной дисперсии) и между (48% дисперсии) популяциями. Этот вывод подтверждается оценками показателей дифференциации и межпопуляционной нуклеотидной дивергенции. Во-вторых, сочетание высокой дифференциации популяций со слабыми различиями между популяциями географически удаленных регионов (6–11% дисперсии). На широкой географической шкале, по согласованным результатам анализа разных генетических маркеров, можно выделить две географические группировки: популяции материкового побережья Японского моря и Сахалино-Курильского региона. Возможно, с учетом генетических (Салменкова, Омельченко, 2000; Осин, 2001; Омельченко и др., 2002; Шубина и др., 2006) и морфологических (Гриценко и др., 1998, 1999, 2002; Савваитова и др., 2001, 2004; Пичугин и др., 2006) данных, исключением будет подразделенность на региональные группы Сахалина и Курильских островов.



**Рис. 2.** Географическое распределение и частоты (в процентах) основных гаплотипов мтДНК *Salvelinus malma krascheninnikovi* по ареалу: 1, 2 – о. Сахалин, побережье Охотского моря; 3 – о. Кунашир; 4 – о. Хоккайдо; 5, 6, 7 – материковое побережье Японского моря.

Для генеалогического дерева *S. t. krascheninnikovi* характерно: большое число альтернативных связей равной длины, отсутствие крупных радиальных кластеров, наличие структурированности гаплотипической сети, лишь частично связанной с географической локализацией популяций. Гаплотипы одной популяции входят в разные структуры МД-дерева, генеалогические расстояния между которыми оказываются очень большими (рис. 3).



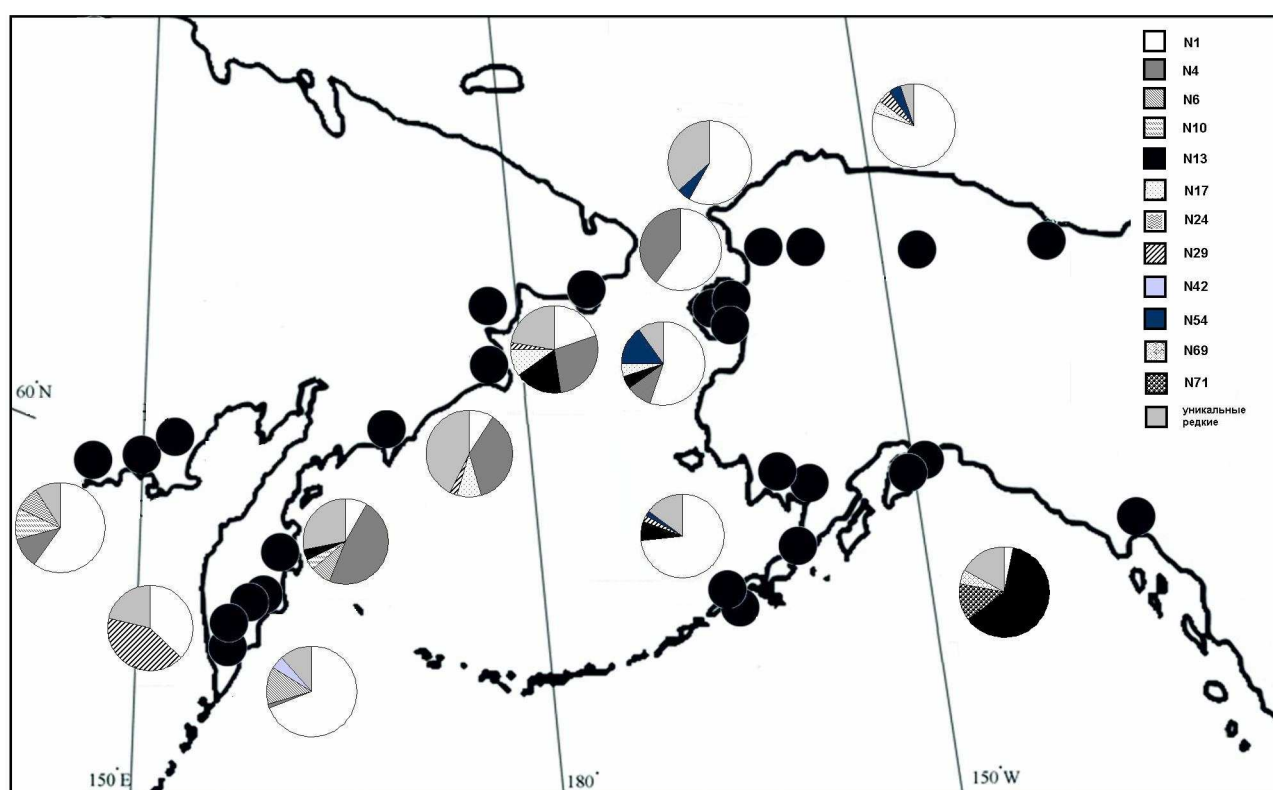
**Рис. 3.** Генеалогическая сеть (MJ-анализ) и распределение числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) между гаплотипами мтДНК *Salvelinus malma krascheninnikovi*. На ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами; размер окружностей пропорционален абсолютным частотам гаплотипов.

Согласно обобщенным результатам генеалогического и NCPA анализов, географическое распространение гаплотипов мтДНК *S. m. krascheninnikovi* обусловлено как популяционно-генетическими процессами (ограниченный генный поток), так и историко-демографическими событиями (расширение и фрагментация ареала). Распределение показателей различий между всеми парами гаплотипов (*mismatch distribution*) (рис. 3) и значения показателей тестов  $F_s$  ( $p < 0.002$ ) также указывают на демографическую и пространственную экспансию у *S. m. krascheninnikovi*. Не менее существенное влияние на географическую сопряженность гаплотипов мтДНК оказали популяционно-генетические процессы. Вероятно, что на протяжении длительных исторических периодов демографическая ситуация в популяциях *S. m. krascheninnikovi* изменялась незначительным образом, и эволюционный процесс заключался в дивергенции популяций на всем ареале. Так как современный ареал южной азиатской мальмы не выходит далеко за пределы предкового водоема, а основные демографические события связаны с циклическими процессами геологического формирования бассейна Японского моря и прилегающих территорий, генеалогическое дерево *S. m. krascheninnikovi* содержит следы вторичных контактов изолированных филогеографических групп.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у *S. m. krascheninnikovi* одного исторического рефугиума, расположенного в бассейне палео-Японского моря (Oleinik et al., 2007). Несмотря на то, что независимые данные подтверждают

дифференциацию популяций на две географические группы, наиболее вероятной причиной дифференциации является фрагментация ареала, связанная с изоляцией Японского и Охотского морей. Особенности генеалогии гаплотипов мтДНК и результаты NSRA анализа указывают на общее происхождение популяций *S. t. krascheninnikovi* и не подтверждают гипотезу (Осинов, Мюге, 2008) о существовании в позднем плейстоцене рефугиума на территории Приморья.

**3.3. Филогеография северной мальмы *Salvelinus malma malma*.** На оригинальном материале исследована филогеография северной мальмы *S. t. malma*, которая является типичным представителем арктической фауны. При этом естественный ареал северной мальмы расположен на территориях, подвергшихся значительным оледенениям в плейстоцене. На основе PCR-RFLP анализа изменчивости мтДНК оценен уровень генетической дифференциации *S. t. malma* Азии и Северной Америки (рис. 4).



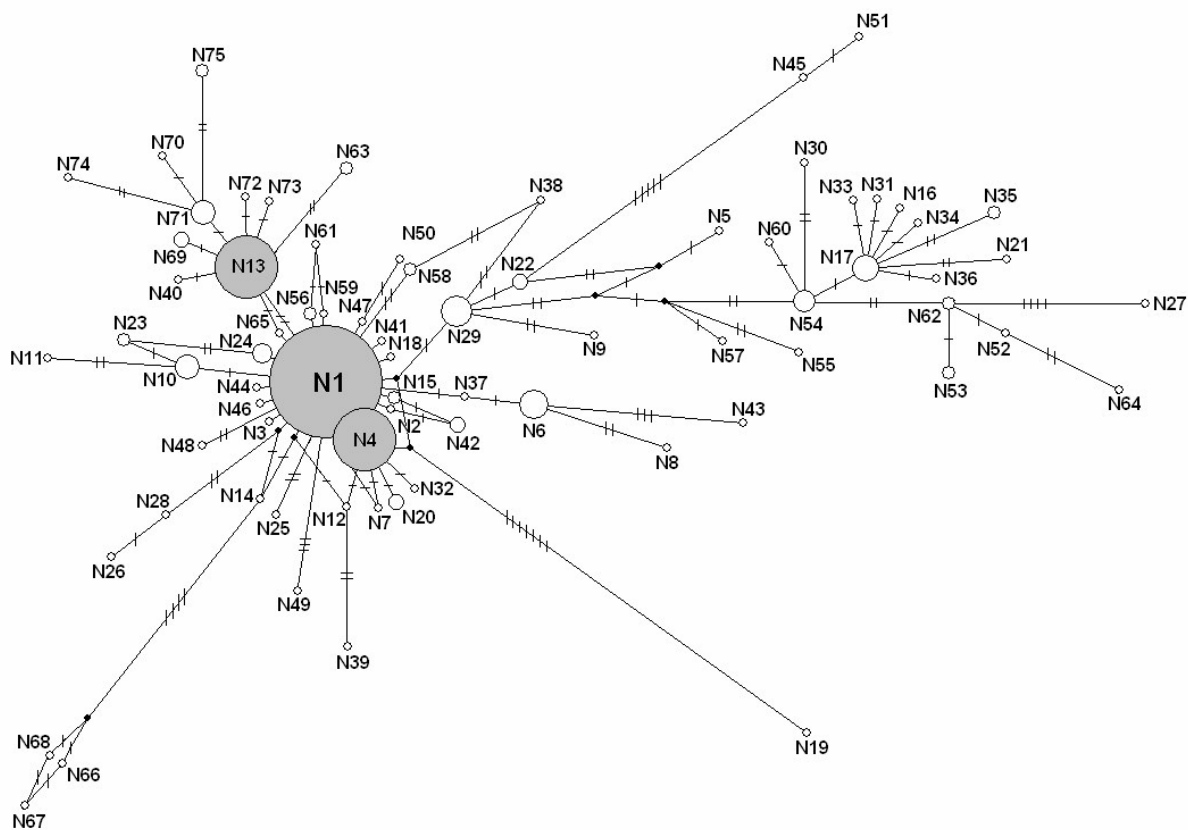
**Рис. 4.** Географическое распределение и частоты (в процентах) основных гаплотипов мтДНК *Salvelinus malma malma* по ареалу. Черными окружностями обозначены места локализации исследованных популяций.

Показано, что для *S. t. malma* на большей части исследованного ареала (бассейны морей Бофорта, Чукотского, Берингова, Охотского) характерна популяционная структура с низким уровнем генетической дифференциации и дивергенции. Генетическая структурированность популяций с противоположных побережий Берингова моря статистически недостоверна ( $p > 0.05$ ). Оценки нуклеотидной дивергенции и показателей генетической дифференциации на разных уровнях популяционной организации *S. t. malma* имеют низкие значения. Основная часть внутривидовой изменчивости мтДНК находится внутри популяций (72.5% дисперсии). Следует также отметить, что различия между континентами значительно

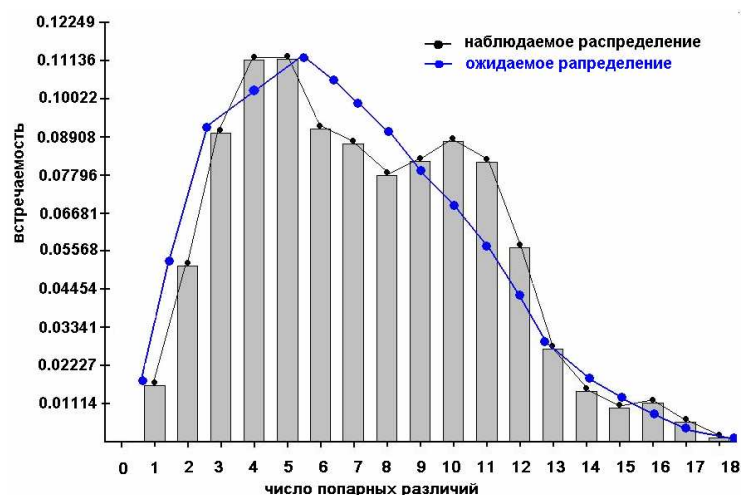


менее выражены, чем между популяциями внутри континентов. Только 6.4% молекулярной дисперсии обусловлено разделением на континентальные области.

Для оценки влияния исторических событий на филогеографическую и популяционно-генетическую структуру *S. m. malma* выполнены генеалогический (рис. 5) и NSRA анализы гаплотипов мтДНК. Реконструированная генеалогия имеет следующие особенности: 1) радиальная структура кластеров; 2) широкое географическое распространение филогеографической группы N1, охватывающее большую часть ареала и исследованных гольцов. Согласно выводам NSRA анализа, в эволюционной истории *S. m. malma* прослеживается периодичность оледенений в плейстоцене. Стабильные периоды, характеризующиеся ограниченным потоком генов между популяциями, сменялись периодами расширения и последующей фрагментации ареала в процессах реколонизации вслед за отступающими ледниками. Распределение показателей различий между всеми парами гаплотипов (*mismatch distribution*) (рис. 5) и значения показателей тестов  $F_s$  ( $p < 0.002$ ) также указывают на демографическую и пространственную экспансию у *S. m. malma*.



**Рис. 5.** Генеалогическая сеть (MJ-анализ) и распределение числа нуклеотидных замен (*mismatch distribution*) между гаплотипами мтДНК *Salvelinus malma malma*. На ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами; размер окружностей пропорционален абсолютным частотам гаплотипов.



Опираясь на палеогеографические реконструкции (Hopkins, 1972; Черешнев, 1996; Mann, Hamilton, 1995) обоснованы вероятные историко-демографические причины современного распространения гаплотипов мтДНК. Наши данные предполагают, что популяции *S. m. malma* Азии и Северной Америки заселялись из одного основного Берингийского рефугиума. Наиболее вероятно, что на рефугиальной стадии в позднеплейстоценовый период предковая популяция прошла через “горлышко бутылки”, и отражением этого демографического процесса является слабая пространственная дифференциация *S. m. malma* по ареалу с низким уровнем дивергенции мтДНК. Генеалогический и NSRA анализы гаплотипов мтДНК *S. m. malma* не подтверждают гипотезы о существовании на территории Берингийской суши двух рефугиумов (DeCicco, Reist, 1999), а также независимого происхождения популяций побережья Охотского моря (Frolov, 2006).

**3.4. Заключение.** В основе обнаруженной генетической дифференциации *S. m. malma* and *S. m. krascheninnikovi* лежат исторические причины. *S. m. krascheninnikovi* сформировалась на территориях, расположенных за границей распространения ледников (Таранец, 1936; Гриценко и др., 1998; Осинов, 2001; Oleinik et al., 2007). Напротив, *S. m. malma* испытала значительное сокращение численности из-за оледенений в позднем плейстоцене, покрывавших большую часть ареала в Северной Пацифике (Осинов, 2001; Redenbach, Taylor, 2002; Oleinik et al., 2007).

Показано, что современные популяции *S. m. malma*, *S. m. krascheninnikovi* и *S. m. lordi* существуют как отдельные филогеографические группы, не имеющие общих предковых гаплотипов мтДНК (Олейник и др., 2005; Oleinik et al., 2007). Иерархическое распределение общей молекулярной дисперсии выявило, что более 91% изменчивости мтДНК обусловлено делением на таксономические группы. Минимальное число нуклеотидных замен между гаплотипами *S. m. krascheninnikovi* и *S. m. lordi* составляет 30, между *S. m. malma* и *S. m. krascheninnikovi* – 31, между *S. m. malma* и *S. m. lordi* – 27 нуклеотидных замен (участки **ND1/ND2**, **Cytb/D-loop**, **ND5/ND6**). Полное расхождение митохондриальных линий свидетельствует о том, что между *S. m. malma*, *S. m. krascheninnikovi* и *S. m. lordi* достигнуто состояние реципрокной монофилии (Neigel, Avise, 1986). Данный вывод представляется крайне важным, поскольку между такими внутривидовыми группировками лососевых рыб, как сезонные расы у кеты (Полякова и др., 2006), смежные поколения четных и нечетных лет у горбуши (Churikov et al., 2001; Churikov, Gharrett, 2002), подвиды у кунджи (Yamamoto et al., 2004), дивергенция которых, определяется границами плейстоцена, наблюдается неполное расхождение митохондриальных линий. Это позволяет допустить, что дивергенция предковых филогеографических групп *S. m. malma*, *S. m. krascheninnikovi* и *S. m. lordi* является более ранним эволюционным событием. В то же время, различия современной популяционно-генетической структуры *S. m. malma* и *S. m. krascheninnikovi* обусловлены циклическими оледенениями в плейстоцене.

В разделе обсуждаются некоторые общие проблемы, связанные с наличием контактных зон между *S. m. malma*, *S. m. lordi* и *S. confluentus* по североамериканскому побережью Тихого океана и между *S. m. malma*, *S. m. krascheninnikovi* и *S. leucotaenis* вдоль азиатского побережья Тихого океана. Сделан вывод, что географическое положение контактных зон по обеим сторонам Тихого океана хорошо вписывается в общую схему распространения зон естественной гибридизации у лососевых рыб (Taylor, 2004), связанных с образованием ледниковых щитов в плейстоцене. Наиболее взвешенной представляется позиция, согласно

которой возникновение зон гибридизации между достаточно сильно дивергировавшими таксонами ограничено историческими случайностями и поэтому результат в каждом конкретном случае является абсолютно локальным. Современные контактные зоны гольцов несут “след” исторической интрогрессивной гибридизации, так как фиксируются в таких регионах, где один из участвующих таксонов больше не обитает (Bernatchez et al., 1995; Glement et al., 1998; Wilson, Bernatchez, 1998; Redenbach, Taylor, 2002; Taylor, 2004). С другой стороны, существует крайне мало свидетельств естественной гибридизации между *S. m. krascheninnikovi* и *S. leucotaenis*, *S. m. malma* и *S. alpinus* или *S. m. krascheninnikovi* и *S. m. malma* в современных зонах симпатрии (Yamamoto et al., 2006; Taylor, 2008). Поэтому в настоящее время генетические структуры трех таксонов мальмы, вероятно, отражают модели изоляции и реколонизации, совмещенные с исторической интрогрессивной гибридизацией, ограниченной контактными зонами.

#### **Глава 4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СИМПАТРИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ГОЛЬЦОВ РОДА *SALVELINUS***

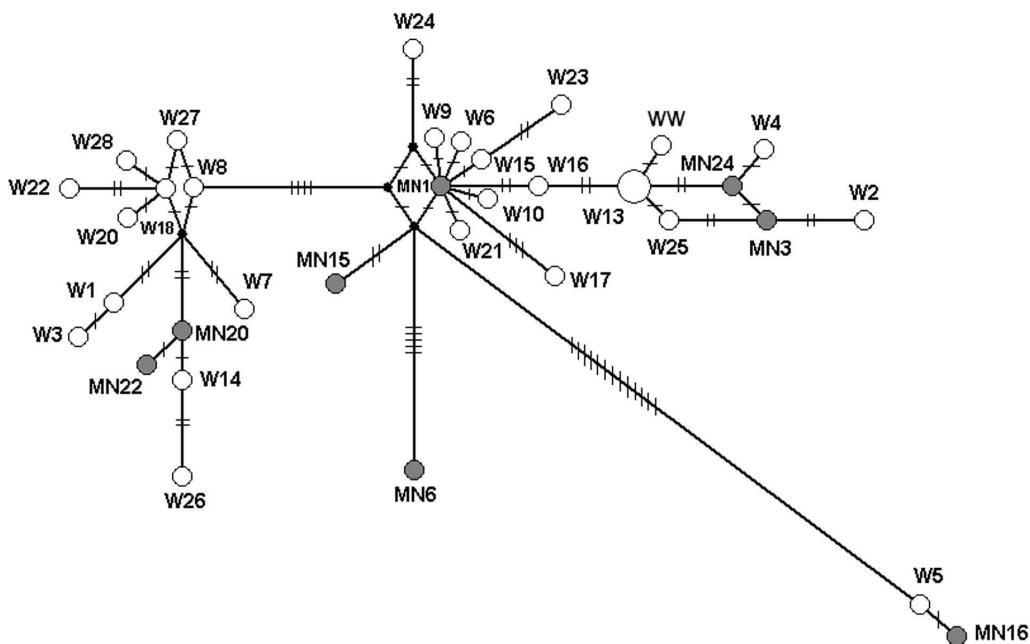
Характерной особенностью гольцов является симпатрическое существование нескольких видов, форм или экотипов, которые достоверно отличаются на основе традиционных морфологических признаков. Для объяснения возникновения современных зон симпатрии гольцов предлагаются разные модели, которые можно разделить на две группы. Модели, опирающиеся на гипотезу аллопатрического видообразования (Майр, 1968), связывают появление симпатрии с множественными инвазиями предковых популяций, представляющих дивергировавшие филетические группы (Викторовский, 1978; Глубоковский и др., 1979; Глубоковский, 1995; Taylor, 1999). Альтернативные модели постулируют симпатрическую дивергенцию предковой популяции основателя (Волобуев и др., 1979; Behnke, 1984, 1989; Савваитова, 1989; Jonsson, Jonsson, 2001; Alekseyev et al., 2002). В связи с этим, исследование симпатричных популяций гольцов северо-востока Евразии представляет несомненный интерес. В водоемах этого региона встречаются несколько разных примеров симпатрического обитания гольцов, которые демонстрируют широкий спектр взаимоотношений и репродуктивной обособленности. Для получения более обоснованных выводов, представляется целесообразным совместить результаты анализа генетической дифференциации симпатричных популяций на основе статистических оценок подразделенности полиморфизма с анализом генеалогий гаплотипов мтДНК. Такой подход позволяет оценить уровень дивергенции популяций, реконструировать их демографическую историю, и на этой основе предложить наиболее вероятный сценарий образования современных зон симпатрии гольцов.

**4.1 Дифференциация *Salvelinus malma malma* и *Salvelinus albus* в бассейне реки Камчатка.** Результаты PCR-RFLP анализа мтДНК подтверждают генетическую дифференциацию между *S. albus* и *S. m. malma* как в местах их симпатрического обитания, так и при оценке на уровне объединения таксономических групп (Олейник и др., 2010). В то же время, величина дивергенции мтДНК между *S. albus* и вероятным предковым видом *S. m. malma* (0.04%) не превышает диапазона внутривидовой изменчивости в популяциях северной мальмы.

На основе реконструкции генеалогии гаплотипов мтДНК установлено, что филогенетическая группа *S. albus*, несомненно, дивергировала от *S. m. malma*, сохранив черты предкового полиморфизма (рис. 6). В настоящий момент между *S.*

*albus* и *S. m. malma* наблюдается неполное расхождение митохондриальных линий. Показано, что хотя *S. albus* и *S. m. malma* имеют общий предковый гаплотип, в то же время, существуют дивергировавшие гаплотипы, которые обнаружены только в популяциях *S. albus*. Такое положение соответствует стадии перехода от состояния полифилии к парафилии (Neigel, Avise, 1986).

Присутствие в периферической части генеалогического дерева *S. albus* гаплотипов северной мальмы может свидетельствовать о вторичном контакте первоначально разделенных популяций с вероятной интрогрессивной гибридизацией. Поэтому низкие оценки степени нуклеотидной дивергенции между *S. albus* и *S. m. malma* обусловлены с одной стороны предковым полиморфизмом, с другой, обменом гаплотипами между дивергировавшими филогенетическими группами. На данном этапе исследования достаточно сложно определить имеется ли в современных симпатричных популяциях поток генов или мы наблюдаем последствия исторической гибридизации.



**Рис. 6.** Генеалогическая сеть (MJ-анализ) гаплотипов мтДНК *Salvelinus albus*. На ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами. Серым цветом обозначены общие гаплотипы у *S. albus* и *S. m. malma*.

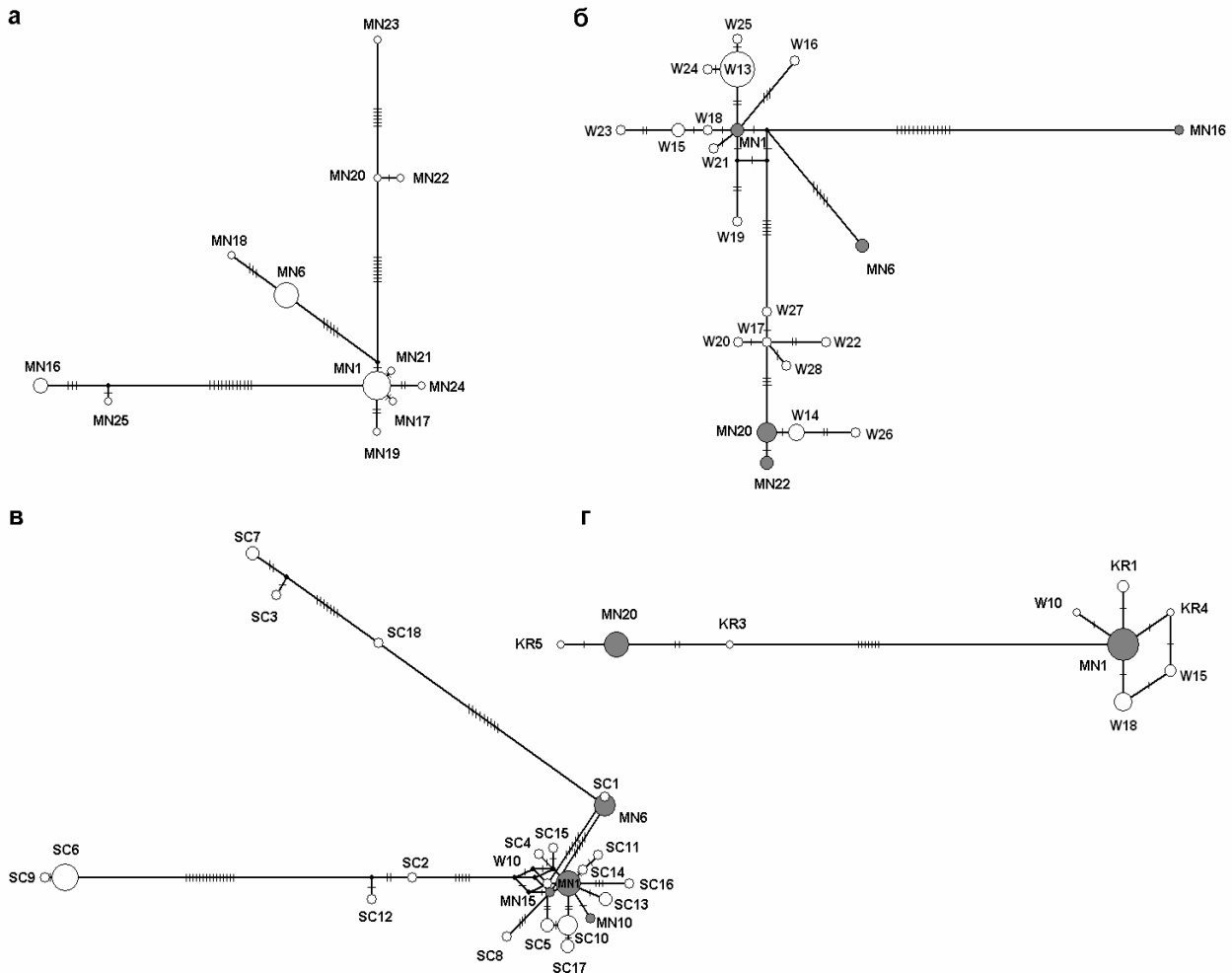
Иерархический анализ молекулярного разнообразия мтДНК позволяет предположить общее происхождение двух аллопатричных популяций *S. albus* и связать появление современной зоны симпатрии в бассейне р. Камчатка с множественными эпизодами ее колонизации (Олейник и др., 2010). В пользу подобного сценария свидетельствуют сложная историческая демография предкового вида *S. m. malma*, отражающая периодичность оледенений в плейстоцене, близость Камчатки к Берингийскому рефугиуму, а также морфологическая (Черешнев, 1996; Reist, Sawatzky, 2010) и генетическая однородность современной северной мальмы на всем ареале, с отсутствием какой-либо внутривидовой таксономической подразделенности (Черешнев, 1982).

#### 4.2. Дифференциация гольцов рода *Salvelinus* в бассейне Кроноцкого озера.

Исследован уровень генетической дифференциации мтДНК между симпатричными озерными популяциями *S. kronocius*, *S. schmidtii*, *S. albus* и предполагаемым предковым видом *S. m. malma* (Oleinik, Skurikhina, 2010). На основе сравнения

показателей разнообразия шести участков мтДНК установлено, что генетическая дифференциация между популяциями гольцов не имеет одного вектора направления, не связана с изменениями в каком-либо одном гене, а затрагивает весь митохондриальный геном. Поэтому анализ небольших участков мтДНК или определение нуклеотидных последовательностей ограниченного числа генов является малоэффективным при исследовании данной группы.

Согласно генеалогии гаплотипов мтДНК, филогенетические группы *S. albus*, *S. schmidti* и *S. kronocius*, несомненно, дивергировали от *S. m. malma*, сохранив черты предкового полиморфизма (рис. 7). Присутствие в центре всех генеалогических деревьев одного из основных гаплотипов северной мальмы, подтверждает, что в настоящий момент между *S. albus*, *S. schmidti*, *S. kronocius* и *S. m. malma* наблюдается неполное расхождение митохондриальных линий. Степень дивергенции между симпатричными популяциями гольцов (0.0061–0.0289%) не превышает диапазон внутривидовой изменчивости *S. m. malma*. При этом большая часть молекулярного разнообразия приходится на внутривидовую компоненту (93% дисперсии), а различия между популяциями вносят меньший вклад в общую изменчивость (7% дисперсии) (табл. 1).



**Рис. 7.** Генеалогическая сеть (MJ-анализ) гаплотипов мтДНК гольцов бассейна оз. Кронотского: а – *S. m. malma*; б – *S. albus*; в – *S. schmidti*; г – *S. kronocius*. На ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами; размер окружностей пропорционален количеству гаплотипов. Серым цветом обозначены общие гаплотипы у озерных гольцов и *S. m. malma*.

Таблица 1

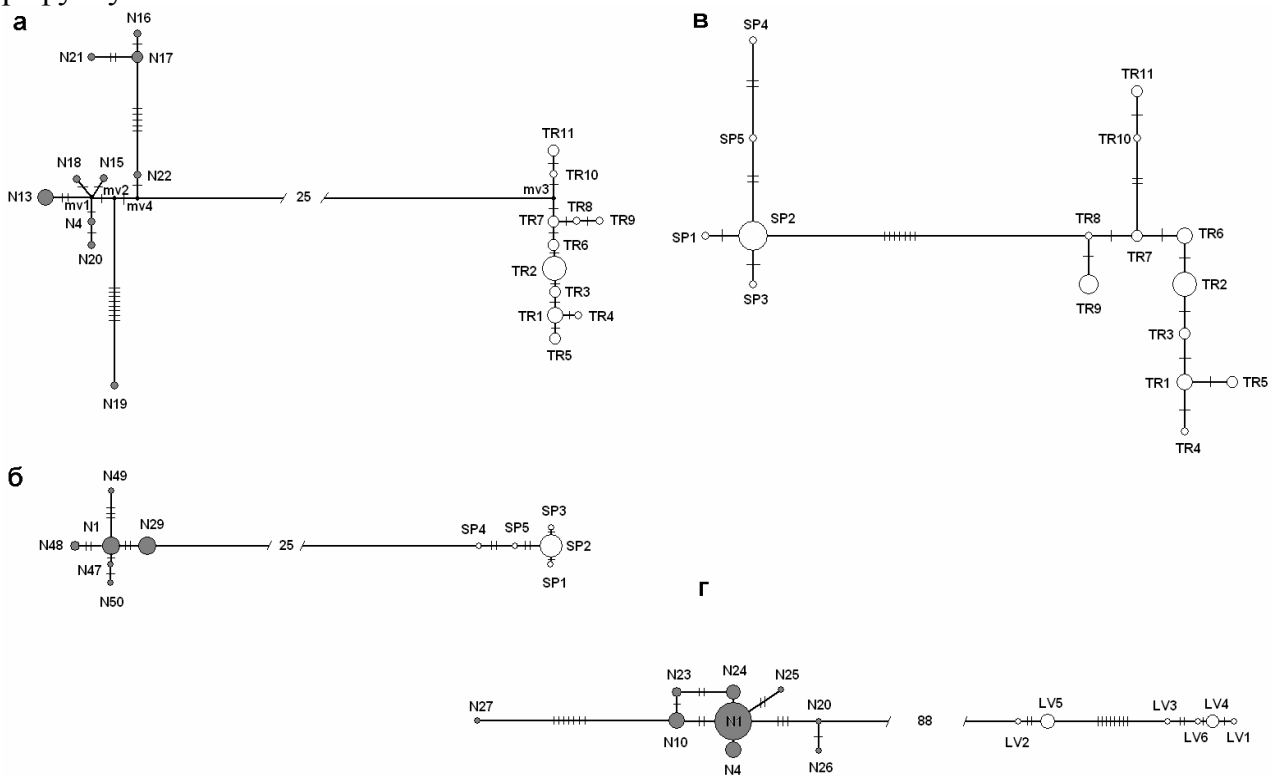
Иерархический анализ межпопуляционных гаплотипических различий гольцов рода *Salvelinus* в зонах симпатрии (Excoffier et al., 1992)

Уровень разнообразия	d.f.	Процент дисперсии (%)	Индекс	Вероятность (p)
Между популяциями <i>S. albus</i> (р. Радуга, оз. Кроноцкое)	1	2.24	0.02238	0.15733
Внутри популяций	56	97.76		
Между группами <i>S. albus</i> и <i>S. m. malma</i>	1	4.86	0.04864	0.02795
Между популяциями внутри групп	2	6.31	0.06306	0.00000
Внутри популяций	111	88.83	0.11170	0.00000
Между популяциями <i>S. m. malma</i> , <i>S. albus</i> , <i>S. kronocius</i> , <i>S. schmidtii</i>	3	6.78	0.06776	<0.001
Внутри популяций	151	93.22		
Между группами <i>S. taranetzi</i> и <i>S. m. malma</i>	1	85.95	0.85950	<0.001
Между популяциями внутри групп	2	3.35	0.0335	<0.001
Внутри популяций	37	10.70	0.89300	<0.001
Между популяциями <i>Salvelinus</i> sp. 4 и <i>S. m. malma</i>	1	93.10	0.93098	<0.001
Внутри популяций	76	6.90		
Между группами <i>S. levanidovi</i> и <i>S. m. malma</i>	1	96.70	0.96698	<0.001
Между популяциями внутри групп	5	0.35	0.00354	<0.001
Внутри популяций	91	2.95	0.97052	<0.001
Между группами <i>S. taranetzi</i> , <i>Salvelinus</i> sp. 4, <i>S. krogiusae</i> и <i>S. m. malma</i>	1	82.57	0.82573	<0.001
Между популяциями внутри групп	6	11.60	0.11601	<0.001
Внутри популяций	102	5.83	0.94174	<0.001

На основе проведенного исследования сделан вывод, что низкие оценки дивергенции мтДНК отражают не уровень репродуктивной изоляции между *S. albus*, *S. schmidtii*, *S. kronocius* и *S. m. malma*, а небольшой временной период с момента расхождения предковых линий, и обусловлены с одной стороны предковым полиморфизмом, с другой – обменом гаплотипами между дивергировавшими группами в результате вероятной исторической интрогрессивной гибридизации. Именно эти факты, по нашему мнению, ограничивают возможность использования результатов анализа мтДНК для обоснования гипотез происхождения симпатричных гольцов оз. Кроноцкого. Но одновременно, полученные результаты расширяют представление об эволюции гольцов в Кроноцком озере, как модельном водоеме для исследования общих механизмов дивергенции симпатричных популяций в относительно недавно сформировавшихся экосистемах.

**4.3. Дифференциация *Salvelinus malma malma* и *Salvelinus taranetzi* в бассейнах озер Аччен и Пекульнейское.** Получены доказательства, что морфологически и экологически различные популяции *S. taranetzi* и *S. m. malma* генетически строго дифференцированы при симпатрическом обитании в двух озерных экосистемах. Разложение общей молекулярной дисперсии частот гаплотипов популяций *S. m. malma* и *S. taranetzi* показало, что большая часть молекулярного

разнообразия приходится на межгрупповую компоненту (86% дисперсии), когда в качестве групп был выбран таксономический уровень объединения (табл. 1). Дивергенция между филогенетическими группами гаплотипов *S. taranetzi* и *S. m. malma* (2.1%) значительно превосходит диапазон внутривидовой изменчивости *S. m. malma* и не могла быть достигнута после колонизации озер в условиях симпатрии. Об этом также свидетельствует анализ генеалогии гаплотипов мтДНК *S. taranetzi* и *S. m. malma* (рис. 8). Приведены доказательства отсутствия потока генов между симпатричными популяциями *S. taranetzi* и *S. m. malma*. Суммируя все имеющиеся данные, можно утверждать, что современные зоны симпатрии *S. taranetzi* и *S. m. malma* в озерах Аччен и Пекульнейское возникли в результате вторичного контакта аллопатричных популяций, которые эволюционировали в изолированных рефугиумах.



**Рис. 8.** Генеалогическая сеть (MJ-анализ) гаплотипов мтДНК гольцов рода *Salvelinus*: **а** – *S. taranetzi* и *S. m. malma* из оз. Аччен и оз. Пекульнейское; **б** – *Salvelinus* sp. 4 и *S. m. malma* из бассейна оз. Начикинское; **в** – *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae*; **г** – *S. levanidovi* и *S. m. malma* из р. Яма. На ветвях указаны мутационные различия между гаплотипами; размер окружностей пропорционален количеству гаплотипов. Серым цветом обозначены гаплотипы *S. m. malma*.

**4.4. Дифференциация *Salvelinus malma malma* и *Salvelinus* sp. 4 в озере Начикинское.** Получены доказательства строгой генетической дифференциации *Salvelinus* sp. 4 и *S. m. malma* в Начикинском озере (Олейник, Скурихина, 2007). По уточненным данным, *Salvelinus* sp. 4 не имеет общих гаплотипов не только с симпатричной популяцией *S. m. malma*, но и с аллопатричными популяциями *S. m. malma*, *S. taranetzi*, *S. krogiusae*. Соотношение оценок дивергенции между симпатричными и аллопатричными популяциями свидетельствует о репродуктивной изоляции популяций *Salvelinus* sp. 4 и *S. m. malma*. Распределение молекулярного разнообразия мтДНК между тестируемыми популяциями существенно отклоняется от обнаруженных закономерностей для *S. m. malma*, так как основная доля

молекулярной дисперсии (93%) приходится на различия между группами *Salvelinus* sp. 4 и *S. m. malma* (табл. 1).

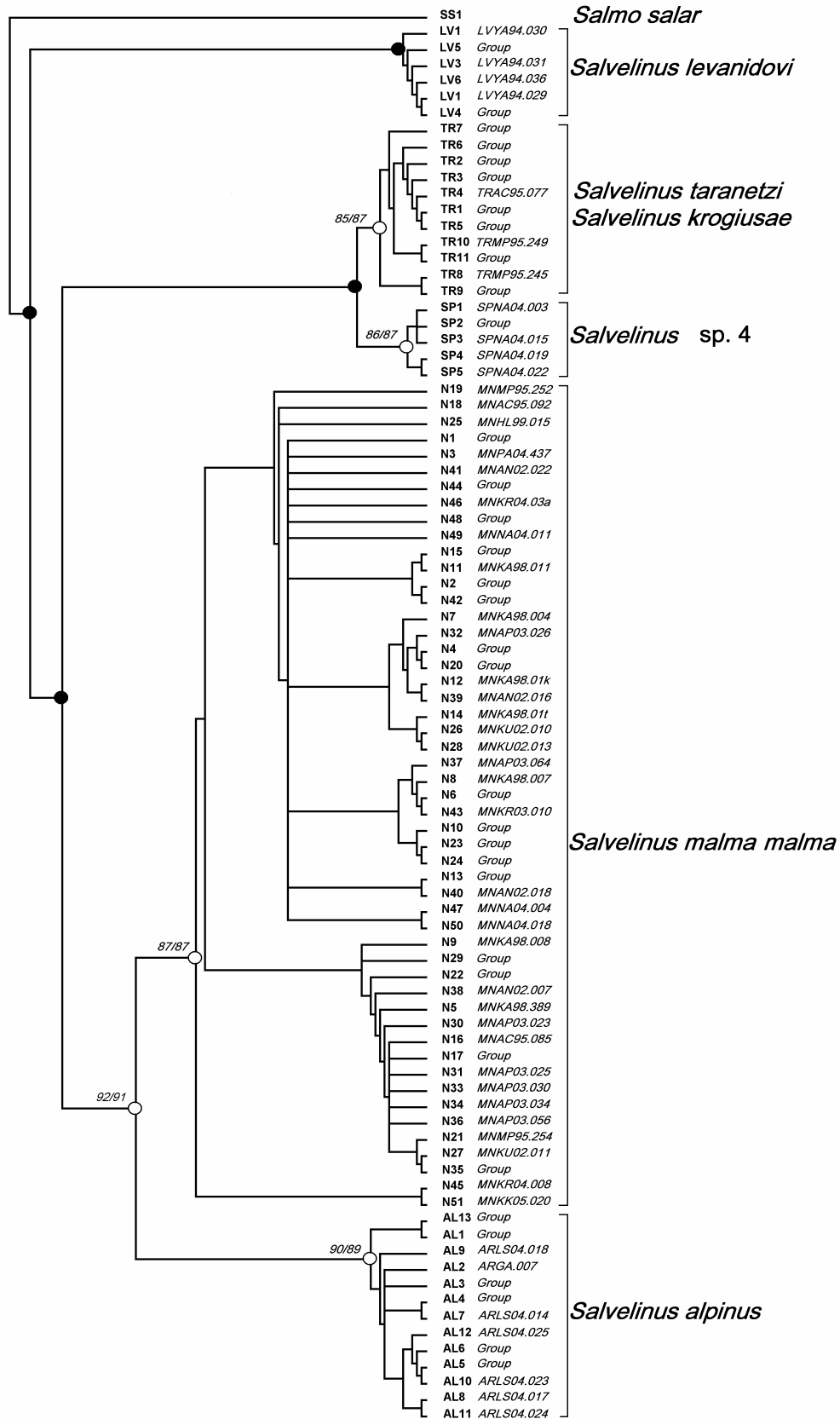
Согласно генеалогическому анализу (рис. 8), филогенетическая группа гаплотипов *Salvelinus* sp. 4 минимальным числом нуклеотидных замен связана с группой *S. taranetzi*. На основе анализа собственных и литературных данных предполагается, что: 1) *Salvelinus* sp. 4 дивергировал от общего предка с *S. taranetzi*, а не от симпатричной с ним *S. m. malma*; 2) *Salvelinus* sp. 4, *S. taranetzi* и *S. krogiusae* являются филогенетически близкими таксонами; 3) появление современной зоны симпатрии в оз. Начикинском связано с вторичным контактом аллопатричных предковых популяций; 4) изолированное оз. Начикинское могло быть отдельным рефугиумом на протяжении всего периода позднего висконсинского оледенения; 5) *Salvelinus* sp. 4 является реликтом одного из первых вселений общего предка в бассейн Тихого океана (Олейник, Скурихина, 2007).

**4.5. Дифференциация *Salvelinus malma malma* и *Salvelinus levanidovi* в бассейне реки Яма.** Согласно популяционно-генетическому и генеалогическому анализам, *S. m. malma* и *S. levanidovi* надежно дифференцируются в местах симпатрического обитания, и представляют сильно дивергировавшие филогенетические группы (рис. 8). Оценки дивергенции нуклеотидных последовательностей мтДНК между *S. levanidovi* и симпатричными и аллопатричными популяциями *S. m. malma* (7.2–7.5%) статистически достоверно не отличаются и значительно превышают уровень межпопуляционной дивергенции *S. m. malma*. Такой уровень дивергенции не мог быть достигнут в условиях симпатрии при частоте мутаций обычно подразумеваемой для мтДНК (Brown et al., 1979; Smith, 1992). Одновременно, это свидетельствует о том, что между современными симпатричными популяциями в р. Яма отсутствует поток генов.

На основе полученных данных утверждается, что зона симпатрии в бассейне р. Яма появилась в результате вторичного контакта аллопатричных популяций. При этом первым вселенцем, вероятно, был *S. levanidovi*. Сформулирована гипотеза, согласно которой предковая популяция *S. levanidovi* длительное время сохранялась в районе палео-Пенжинской низменности, являющейся одним из самых крупных рефугиумов в плейстоцене (Черешнев и др., 1989).

**4.6. Заключение.** Исследованные экосистемы северо-востока Евразии представляют разные модели зон симпатрии. Условно их можно разделить на две группы. Для первой характерно симпатрическое существование удаленных, давно дивергировавших популяций гольцов, для второй – молодых, дивергировавших относительно недавно. Попытки обнаружить генетическую дифференциацию на основе анализа изменчивости мтДНК между симпатричными популяциями гольцов, обитающими в озерных экосистемах, во многих случаях не привели к положительным результатам (Danzmann et al., 1991; Brunner et al., 1998, 2001; Радченко и др., 2006; Салменкова и др., 2005; Alekseyev et al., 2009). Был сделан вывод о том, что низкие разрешающие возможности связаны с общим невысоким уровнем разнообразия мтДНК гольцовых рыб, исторические ареалы которых находились на территориях циклических оледенений в плейстоцене (Brunner et al., 2001). Тем не менее, очевидно, что мтДНК в качестве молекулярного маркера оказывается достаточно эффективным инструментом при решении задач дифференциации и определения степени дивергенции между симпатричными популяциями гольцов, представляющими удаленные филогенетические линии (Олейник и др., 2003, 2004; Олейник, Скурихина, 2007).





**Рис. 9.** Филогенетические отношения гольцов рода *Salvelinus* на основе PCR-RFLP анализа участков мтДНК: *ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*. Топология консенсусного дерева гаплотипов мтДНК соответствует дендрограммам, полученным методом NJ (дистанции: Nei, Tajima, 1981; Nei, Miller, 1990), MP (*heuristic search*,  $l = 278$ ,  $CI = 0.5395$ ,  $RI = 0.9047$ ). Узлы с максимальной статистической поддержкой ( $BS > 98\%$ ) обозначены черным кружком, с умеренной поддержкой – светлым.

Результаты филогенетического анализа, представленные в виде топологии консенсусного дерева гаплотипов мтДНК (рис. 9), свидетельствуют не только о значительной дивергенции между симпатричными популяциями гольцов в озерах Аччен, Начикинское, Дальнее, Пекульнейское и реке Яма, но и предполагают их происхождение от разных предковых линий. Поэтому ни один из гаплотипов мтДНК *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae* и *S. levanidovi* нельзя считать производным от гаплотипов симпатричной *S. m. malma* или аллопатричного *S. alpinus*. В этом случае появление обсуждаемых современных зон симпатрии связано с вторичным контактом предковых популяций. Генеалогический анализ также свидетельствует о существовании значительно дивергировавших филогенетических групп, каждая из которых коалесцирует к собственному предковому гаплотипу мтДНК.

Данный вывод противоречит гипотезам о формировании биоразнообразия гольцов в пресноводных водоемах Голарктики в результате симпатрической дивергенции от исходного проходного морского экотипа мальмы (Савваитова, 1989), или диверсификации единой популяции на самостоятельные репродуктивно обособленные единицы (Behnke, 1981, 1989; Jonsson, Jonsson, 2001). Показано, что не существует общей модели образования зон симпатрии даже в пределах достаточно ограниченного географического региона. Напротив, более вероятно, что уникальные геологические и экологические условия отдельных водоемов способствовали реализации той или иной эволюционной траектории. Анализ мтДНК, в совокупности с кариологическими, генетико-биохимическими и морфологическими данными, следующим образом моделирует эволюцию исследованных симпатричных популяций гольцов рода *Salvelinus*:

- вторичный контакт предков значительно дивергировавших филетических линий (озера Аччен, Пекульнейское, Начикинское, Дальнее, р. Яма), который в некоторых случаях, вероятно, мог сопровождаться исторической интрогрессивной гибридизацией;
- множественные вселения предковых популяций близкородственных филетических линий, дивергировавших в разных рефугиумах, объединяющиеся с интрогрессивной гибридизацией (бассейн р. Камчатка).

Все примеры обсуждаемых выше зон симпатрии гольцов рода *Salvelinus* показали соответствие направлений экологической, морфологической и генетической дифференциации. Таким образом, в рамках проведенного генетического анализа, получено подтверждение сформулированной ранее гипотезы (Викторовский, 1978; Глубоковский и др., 1979; Глубоковский, 1995), что основными факторами возникновения биоразнообразия у гольцов были пространственная изоляция и различия конкретных биоценозов, в которых проходила самостоятельная эволюция дивергировавших популяций.

## **Глава 5. ФИЛОГЕНИЯ ГОЛЬЦОВ РОДА SALVELINUS ПО ДАННЫМ PCR-RFLP АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК**

**5.1. Обзор исследований по систематике и филогении гольцов рода *Salvelinus*.** Гольцы являются важной составной частью арктических и субарктических пресноводных экосистем Европы, Восточной Сибири, Северо-Востока Азии и Северной Америки, относящихся к бассейнам Тихого, Атлантического и Северного Ледовитого океанов. При этом степень морфоэкологической изменчивости гольцов оказалась намного выше, чем у других представителей ихтиофауны северных арктических сообществ. Этот род голарктических рыб представляет уникальный природный

материал для изучения процессов эволюции и возникновения биоразнообразия на видовом и внутривидовом уровнях (Викторовский, 1978; Глубоковский, 1995; Черешнев и др., 2002; Adams et al., 2007).

В разделе дан обзор филогенетических отношений гольцов на основе морфологических, кариологических и генетических маркеров. Отмечается, что, несмотря на большое количество исследований, к настоящему времени не удалось синтезировать все имеющиеся данные в обобщенную филогению митохондриальных групп, согласованную с морфологической филогенией рода. Филогенетические взаимоотношения гольцов остались неразрешимы, поскольку были выявлены, во-первых, полифилия внутри *S. malma*, *S. alpinus* и *S. confluentus*, во-вторых, парафилетические отношения *S. malma* с *S. alpinus*, *S. malma* с *S. confluentus*, *S. alpinus* с *S. confluentus* (Grewe et al., 1990; Brunner et al., 2001; Redenbach, Taylor, 2002; Elz, 2003; Oleinik et al., 2007; Taylor et al., 2008; Alekseyev et al., 2009).

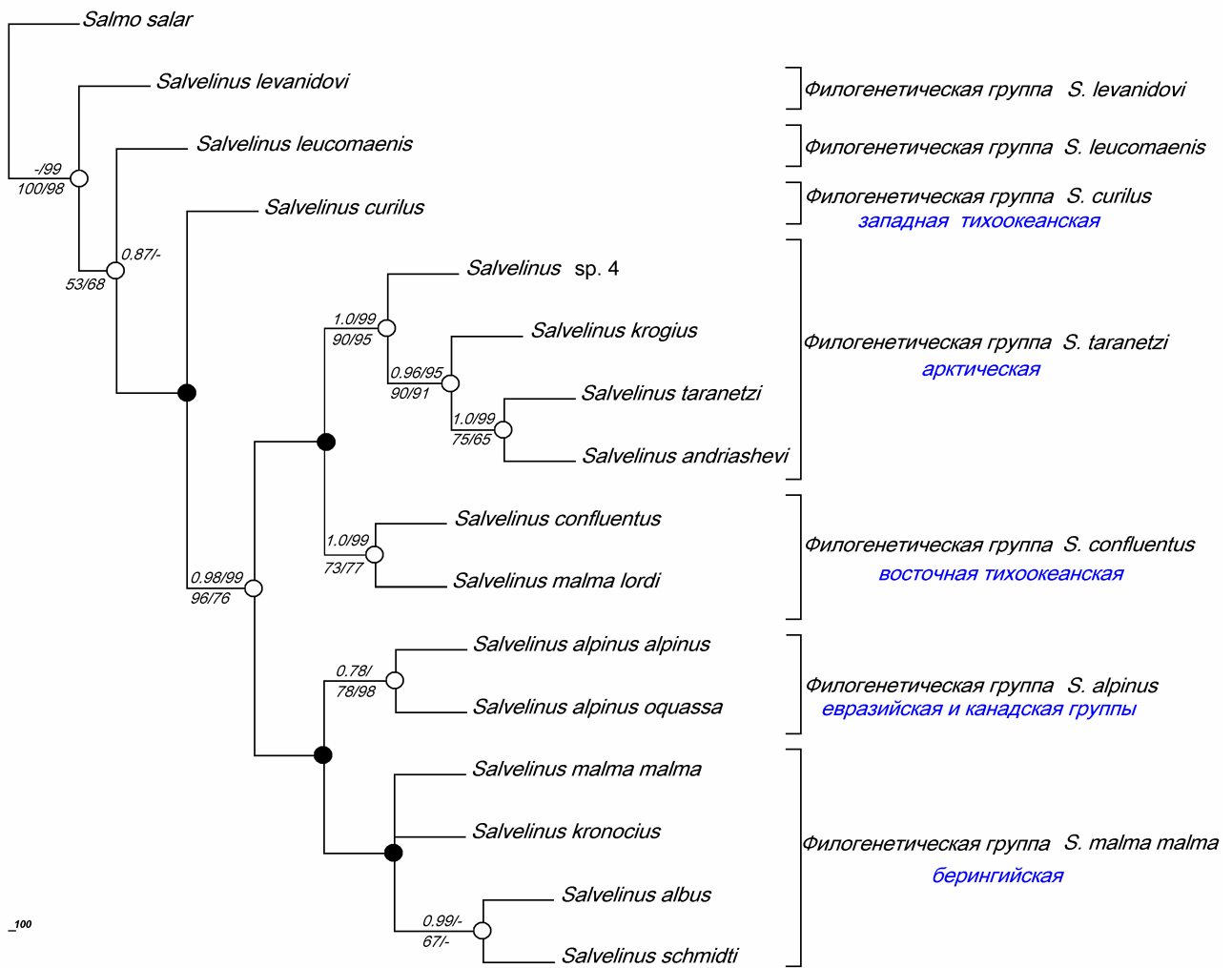
**5.2. Филогенетические отношения между гаплотипами мтДНК гольцов рода *Salvelinus*.** На собственном материале изучена генетическая дивергенция гольцов, представляющих следующие таксоны рода *Salvelinus*: *S. albus*, *S. a. alpinus*, *S. a. oquassa*, *S. andriashevi*, *S. confluentus*, *S. krogiusae*, *S. kronocius*, *S. leucomaenis*, *S. levanidovi*, *S. m. malma*, *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*), *S. m. lordi*, *S. schmidtii*, *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4. Для установления уровня межродовых отличий и в качестве ближайшей внешней группы рассматривали атлантического лосося *Salmo salar*. Филогенетический анализ объединил два последовательных этапа реконструкций на основе PCR-RFLP анализа трех (*ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*) и шести (*ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*, *ND3/ND4L/ND4*, *A8/A6/COIII*, *COI/COII*) участков мтДНК, с использованием дистанционных (UPGMA, NJ) и признаковых (MP, BI) методов.

Независимо от набора признаков отсутствуют принципиальные изменения как в группировке филогенетических групп гаплотипов, так и в последовательности присоединения ветвей внутри кластеров, объединяющих близкие таксоны гольцов. Определяются несколько групп гаплотипов, дифференцирующих таксоны гольцов: *S. levanidovi* (*BS* > 98%), *S. leucomaenis* (*BS* > 98%), *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*) (*BS* > 98%), *S. taranetzi* (*BS* > 50%), *Salvelinus* sp. 4 (*BS* > 85%), *S. alpinus* (*BS* > 98%), *S. m. lordi* (*BS* > 98%), *S. confluentus* (*BS* > 98%). К статистически достоверным элементам топологии относятся следующие макрокластеры гаплотипов мтДНК: 1) ((*S. m. malma*, *S. albus*, *S. kronocius*, *S. schmidtii*) *S. alpinus*) (*BS* > 94%); 2) ((*S. taranetzi*, *S. andriashevi*, *S. krogiusae*) *Salvelinus* sp. 4) (*BS* > 96%); 3) (*S. m. lordi*, *S. confluentus*) (*BS* > 50%). Увеличение числа признаков, во-первых, приводит к разрешению политомии в основании дерева и определяет дивергенцию трех базальных ветвей *S. leucomaenis*, *S. levanidovi* и *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*); во-вторых, позволяет установить последовательность дивергенции в группе гаплотипов (*S. taranetzi*, *S. krogiusae*, *S. andriashevi*). В то же время, увеличение числа признаков не отразилось на структуре кластера гаплотипов группы (*S. m. malma*, *S. albus*, *S. kronocius*, *S. schmidtii*), в которой не наблюдается устойчивых структурных элементов, связанных с предполагаемой таксономической дифференциацией.

**5.3. Филогенетические взаимоотношения гольцов рода *Salvelinus* по данным анализа мтДНК.** Для определения последовательности дивергенции и реконструкции филогенетических отношений гольцов рода *Salvelinus* был использован кладиристический подход (Hennig, 1966), ранее успешно применявшийся при исследовании филогении лососевых рыб (Олейник, 1994, 1997). На основе

результатов кладиического анализа, а также фенетического и филогенетического анализов гаплотипов мтДНК была реконструирована филограмма, представляющая дивергенцию материнских филогенетических линий гольцов рода *Salvelinus* (рис. 10).

Из филограммы следует, что в эволюции группы существовало четыре цикла дивергенции. Первые включают последовательную дивергенцию базальных ветвей *S. levanidovi*, *S. leucomaenis*, *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*), и более позднее разделение филума общего предка рода. Следующий цикл привел к формированию филогенетических групп *S. alpinus* и *S. m. malma* в одной филетической ветви. Одновременно с этим, второй филум дивергировал на общего предка *S. confluentus* и *S. m. lordi*, а также общего предка филогенетической группы *S. taranetzi*. На последнем этапе эволюции происходила диверсификация таксонов внутри филогенетических групп.



**Рис. 10.** Филогенетические отношения гольцов рода *Salvelinus* по данным анализа *ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*, *ND3/ND4L/ND4*, *A8/A6/COIII*, *COI/COII* фрагментов мтДНК: консенсусная филограмма. Внешняя группа *Salmo salar*. Узлы с максимальной статистической поддержкой ( $BS > 98\%$ ,  $PP > 0.98$ ) обозначены черным кружком, с умеренной поддержкой – светлым. Показаны значения  $PP/BS$  для BI- и ML-деревьев (выше оси),  $BS/BS$  для NJ- и MP-деревьев (ниже оси).

Согласно филограмме подтверждаются монофилетические группы гольцов, маркируемые соответствующими филогенетическими группами гаплотипов мтДНК: (*S. m. lordi*, *S. confluentus*); ((*S. taranetzi*, *S. andriashevi*, *S. krogiusae*) *Salvelinus* sp. 4); ((*S. confluentus*, *S. m. lordi*) (*Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae*, *S. taranetzi*, *S. andriashevi*)); (*S. m. malma*, *S. albus*, *S. kronocius*, *S. schmidti*); ((*S. m. malma*, *S. albus*, *S. kronocius*, *S. schmidti*) *S. alpinus*). Сопоставление топологий кладограмм и оптимальных деревьев, построенных для разного рода терминальных групп, свидетельствует, что использованный комплекс признаков содержит филогенетический сигнал о структуре анализируемого биоразнообразия.

#### 5.4. Филогенез гольцов рода *Salvelinus*: вероятная модель эволюции.

Сравнительный анализ дендрограмм, полученных на основе генетических данных (Grewe et al., 1990; Phillips et al., 1995, 1999; Phillips, Oakley, 1997; Олейник, Скурихина, 1999; Brunner et al., 2001; Elz, 2003; Crespi, Fulton, 2004; Радченко, 2005; Шубина и др., 2006; Oleinik et al., 2007; Hubert et al., 2008; Taylor et al., 2008; Yamamoto et al., 2012; и др.), позволил с большей степенью надежности подтвердить последовательность дивергенции и эволюционные связи гольцов рода *Salvelinus*. Для тестирования присутствия филогенетического сигнала также привлекались данные об эволюции кариотипов (Викторовский, 1978; Phillips et al., 1994; Фролов, 2000; и др.). Согласно молекулярно-генетическим исследованиям, род *Salvelinus* является достоверно монофилетическим. Базальным филумом, наиболее близким к общему предку рода, вероятно, является американская палия *S. fontinalis*. К базальным таксонам также относятся *S. namaycush*, *S. levanidovi*, *S. leucomaenis*, *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*). Для этой группы показано совпадение темпов и направления эволюции разных генетических маркеров, поскольку перечисленные таксоны представляют две кариологические линии (*S. fontinalis*, *S. namaycush*, *S. levanidovi*) и (*S. leucomaenis*, *S. m. krascheninnikovi*), первая из которых объединяет виды с наиболее примитивными кариотипами среди гольцов (Фролов, 2000). Отмечается, что *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*) выступает в качестве сестринской группы по отношению ко всем остальным таксонам гольцов. Следующий этап филогенеза связан с разделением общего предкового ствола на два филума, дивергенция которых привела к образованию четырех монофилетических групп. Несмотря на некоторые топологические расхождения, генетические данные хорошо согласуются с предложенной филогенетической гипотезой.

В разделе дан подробный анализ основным противоречиям между молекулярно-генетическими и морфологическими представлениями о филогенезе гольцовых рыб, относительно положения филумов *S. namaycush*, *S. alpinus*, *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*), *S. boganidae*, *S. neiva* и *S. confluentus*. Суммируя результаты обсуждения, можно заключить:

- отсутствие соответствия в дивергенции базальных ветвей рода *Salvelinus* может быть связано с разной скоростью эволюции морфологических и генетических маркеров;
- филогенетическое положение ветвей *S. alpinus*, *S. taranetzi*, *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*) определяется конвергентным сходством по отдельным морфологическим признакам;
- противоречия в отношении нейвы *S. neiva* и боганидской палии *S. boganidae*, вероятно, связаны с интрогрессией мтДНК;
- неустойчивое положение *S. confluentus* определяется как небольшим числом морфологических синапоморфий, так и присутствием конфликтных

филогенетических сигналов в топологиях дендрограмм, построенных на основе индивидуальных генов.

Предложенная гипотеза в той или иной степени вступает в конфликт с гипотезами морфологической эволюции рода. В наибольшей степени это касается существования общей филогенетической линии *S. alpinus* complex (Savvaitova, 1980, Савваитова, 1989) или *S. alpinus* complex и *S. malma* complex (Behnke, 1984, 1989). Митохондриальная филогенетическая группа не соответствует полностью *S. malma* complex, так как не включает *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*) и *S. m. lordi*. В рамках *S. alpinus* complex также не все морфологические эволюционные группы поддерживаются генетическими данными (Brunner et al., 2001; Осинов и др., 2003; Alekseyev et al., 2009).

**5.5. Биogeография и эволюция географических границ основных филетических митохондриальных линий гольцов рода *Salvelinus*.** Внесены уточнения в существующие представления об эволюции географических границ филогенетических групп гольцов рода *Salvelinus*. Предложена биогеографическая модель изоляции и реколонизации из аллопатричных рефугиумов, включающая описание границ современного распространения, зон симпатрии и возможных областей исторического вторичного контакта. Биогеографическая схема содержит расширенный таксономический состав филогенетических групп гольцов, объединяя результаты исследований филогеографии гаплотипов мтДНК (Wilson et al., 1996; Taylor et al., 1999, 2008; Brunner et al., 2001; Redenbach, Taylor, 2002; Elz, 2003; Yamamoto et al., 2004; Радченко, 2004, 2005; Радченко и др., 2006; Шубина и др., 2006; Шедько и др., 2007; Alekseyev et al., 2009; Yamamoto et al., 2012), дополненные анализом аллозимных ядерных локусов (Osinov, 1999; Осинов, 2001, 2002; Осинов и др., 2003).

Следует отметить, что расположение зон вторичного контакта и исторической гибридизации гольцов соответствует гипотезе “потревоженных мест обитания” (Hubbs, 1955) и мозаичной модели гибридных зон (Taylor, 2004).

**Филогенетическая группа *Salvelinus levanidovi*.** Согласно собственным данным, центром возникновения и, одновременно, наиболее вероятным рефугиумом в плейстоцене для предковой популяции *S. levanidovi*, является район палео-Пенжинской низменности.

**Филогенетическая группа *Salvelinus leucomaenis*** объединяет четыре подвида, выделенных на основе морфологических признаков и географической модели распространения: *S. leucomaenis leucomaenis*, *S. l. japonicus*, *S. l. pluvius*, *S. l. imbricus*, с центром возникновения в Японском рефугиуме (бассейн палео-Японского моря) (Гриценко, 1975).

**Филогеографическая группа *Salvelinus curilus* (западная тихоокеанская)** объединяет южную азиатскую мальму *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*), гольца Миябе *S. m. miyabeu* (оз. Сикарибетсу, о-в Хоккайдо) и палию Гриценко *S. gritzenkoi* (оз. Черное, о-в Онекотан). Наиболее вероятным рефугиумом группы является бассейн палео-Японского моря (Oleinik et al., 2007).

**Филогенетическая группа *Salvelinus taranetzi* (арктическая)** включает азиатские популяции гольца Таранца *S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4 (оз. Начикинское), гольца Крогиус *S. krogiusae* (оз. Дальнее), чукотского гольца *S. andriashevi* (оз. Эстихед), боганидскую палию *S. boganidae* и малоротую палию *S. elgyticus* (оз. Эльгыгытгын), колымско-чукотскую группу озерных гольцов *Salvelinus* sp. (оз. Найвак, Чукотка; оз. Макси, оз. Джульетта, бассейн р. Колыма). В эту

филогенетическую группу также входит *S. a. erythrinus* (первоначально *S. a. stagnalis*) с арктического побережья Канады (NWT) и из изолированных озерных популяций Северной Аляски, а также *Salvethymus svetovidovi*. Наиболее вероятными рефугиумами для данной группы могут быть Берингия или Арктический островной рефугиум (Behnke, 1972; Crossman, McAllister, 1986; Brunner et al., 2001). Расселение из рефугиума, вероятно, происходило не в результате непрерывного расширения ареала, а через повторяющиеся миграции из одной предковой популяции.

**Филогенетическая восточная тихоокеанская группа** включает *S. m. lordi* и формально не названные “coastal” и “interior” формы *S. confluentus*. Предполагается, что у *S. confluentus* существовало два рефугиума, расположенных у южной границы Кордильерского ледникового щита – Тихоокеанский и Чехалис (Taylor et al., 1999). Возможно, что рефугиум Чехалис представлял историческую область симпатрии для *S. confluentus* и *S. m. lordi* (Redenbach, Taylor, 2002).

**Филогенетическая группа арктического гольца *Salvelinus alpinus*** включает озерных гольцов *S. a. salvelinus* Центральной Европы, европейские популяции *S. a. alpinus*, принадлежащие бассейнам Атлантического и Северного-Ледовитого океанов, восточно-сибирские популяции *S. a. alpinus*, *S. a. oquassa* с восточного побережья Северной Америки. Все исследованные популяции, виды (или формы) гольцов Забайкалья и Таймыра относятся к этой группе: голец Дрягина *S. drjagini* (оз. Лама), боганидская паляя *S. boganidae* (оз. Лама), голец-”пучеглазка” *S. a. alpinus* (оз. Лама, оз. Собачье), голец-”путоранчик” *S. a. alpinus* (оз. Аян), даватчан *S. a. erythrinus* (оз. Фролиха, оз. Гольцовое, оз. Леприндо).

По согласованным данным, филогенетическая группа арктического гольца объединяет канадскую (*S. a. oquassa*) и евразийскую (все остальные таксоны) филогруппы *S. alpinus*. Отличительной особенностью данной группы является ее распространение, охватывающее Евразию и часть Северной Америки, несмотря на отсутствие современной трансатлантической миграции у *S. alpinus*. Наиболее вероятной является изоляция предка канадской филогруппы в прибрежном рефугиуме *Northeastern Banks*, в настоящее время затопленном (Brunner et al., 2001). В то же время, основным рефугиумом предковой евразийской супергруппы *S. alpinus* был Североамериканский атлантический рефугиум в долине реки Миссиссиппи (Wilson et al., 1996; Brunner et al., 2001).

**Филогенетическая группа *Salvelinus malma malma* (берингийская)** объединяет северную мальму *S. m. malma* Азии и Северной Америки, белого гольца *S. albus*, эндемичных гольцов оз. Кроноцкого – длинноголового гольца *S. kronocius* и гольца Шмидта *S. schmidti*. К этой группе относятся каменный голец (бассейн р. Камчатка), озерные гольцы *Salvelinus* sp. из водоемов, принадлежащих к бассейну Охотского моря (Элекчанские озера, оз. Мак-Мак, оз. Хадды, оз. Гранд) и, возможно, нейва *S. neiva* (оз. Уегинское).

Основной рефугиум берингийской группы находился на Берингийском мосту, из которого в послеледниковое время происходило расселение предковой популяции *S. m. malma* с последующей колонизацией Азии и Северной Америки (Осинов, Павлов, 1998; Brunner et al., 2001; Осинов, 2001; Redenbach, Taylor, 2002; Oleinik et al., 2007). Границы современного распространения берингийской группы полностью совпадают с ареалом северной мальмы *S. m. malma* (Oleinik et al., 2007; Alekseyev et al., 2009).

**5.6. Молекулярные датировки основных этапов дивергенции мтДНК гольцов рода *Salvelinus*.** Опираясь на результаты проведенного филогенетического анализа, оценки генетической дивергенции (табл. 2), и допуская, что молекулярные

изменения происходят достаточно равномерно, чтобы служить эволюционными часами, в разделе представлены оценки абсолютного времени дивергенции основных митохондриальных линий гольцов рода *Salvelinus*. Расчет времени дивергенции был выполнен для трех оценок скорости эволюции мтДНК: 0.92% (Осинов, Лебедев, 2004), 1% (Smith, 1992), 1.6% (Брыков и др., 2010) нуклеотидных замен за миллион лет на две линии. Несмотря на широкий доверительный интервал абсолютных временных оценок периодов дивергенции гольцов, представленные в диссертации результаты сопоставимы с датировками, полученных для других генетических данных, в том числе с использованием более точных статистических методов (Осинов, Лебедев, 2004).

Согласно гипотезе, дивергенция базальной группы таксонов (*S. fontinalis*, *S. namaycush*, *S. levanidovi*, *S. leucomaenis*) от общего предка рода приходится на границу миоцена и плиоцена. На период 3–2 млн лет назад попадает два дивергентных события: обособление предковой линии *западной тихоокеанской* группы *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*), и последующее разделение общего предка рода на два митохондриальных филума. Следующий цикл относится к временному отрезку около 1 млн лет назад и включает дивергенцию обоих филумов. В одном филуме сравнительно быстро произошло обособление *арктической* и *восточной тихоокеанской* филогрупп и дивергенция общего предка последней на линии *S. confluentus* и *S. m. lordi*. Второй филум в это же время дивергировал на филогенетические группы *S. m. malma* и *S. alpinus*. Диверсификация внутри филогенетических групп проходила в среднем – позднем плейстоцене (0.781–0.0117 млн лет назад).

Таблица 2

Степень дивергенции нуклеотидных последовательностей мтДНК (*ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*, *ND3/ND4L/ND4*, *A8/A6/COIII*, *COI/COII*) гольцов рода *Salvelinus* (в процентах нуклеотидных замен на сайт) (Nei, Tajima, 1983; Nei, 1987)

Таксон	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Salmo salar</i>														
<i>S. leucomaenis</i>	14													
<i>S. levanidovi</i>	15	8.53												
<i>S. taranetzi</i>	13	6.74	7.00											
<i>S. andriashevi</i>	13	6.78	7.11	0.06										
<i>S. krogiusae</i>	13	6.76	7.02	0.13	0.08									
<i>Salvelinus</i> sp. 4	13	6.94	7.17	0.28	0.22	0.25								
<i>S. m. lordi</i>	13	6.69	7.00	0.88	0.84	0.92	1.02							
<i>S. alpinus</i>	12	6.74	7.02	2.04	2.03	2.06	2.11	2.11						
<i>S. curilus</i>	13	6.54	6.39	1.98	2.06	2.03	2.18	2.15	2.67					
<i>S. m. malma</i>	13	7.36	6.85	2.33	2.38	2.35	2.41	2.56	1.25	3.16				
<i>S. albus</i>	13	7.24	6.81	2.25	2.30	2.27	2.35	2.49	1.24	3.09	0.02			
<i>S. kronocius</i>	13	7.35	6.89	2.29	2.34	2.31	2.39	2.52	1.23	3.15	0.04	0.02		
<i>S. schmidtii</i>	13	7.24	6.72	2.21	2.25	2.22	2.30	2.43	1.24	3.04	0.04	0.02	0.02	
<i>S. confluentus</i>	13	6.87	7.04	0.97	0.91	0.94	1.09	0.89	2.57	2.49	2.92	2.84	2.88	2.78

## Глава 6. ВЛИЯНИЕ НАЧАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ОПИСАНИЯ ТАКСОНОВ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

В филогенетических исследованиях, реконструирующих дивергенцию таксонов на основе сравнительных данных, начальные условия описания во многом определяют надежность итоговых гипотез (Пое, 1998; Nylander, 2001). Несмотря на



достаточное число используемых маркеров, большинство исследований лососевых рыб ограничивается анализом отдельных генов или последовательностей ДНК одного гена разной длины у ограниченной выборки таксонов. Полные последовательности митохондриальных генов есть только для *S. fontinalis* и *S. alpinus* (Doiron et al., 2002). Учитывая большое фенетическое разнообразие гольцов, объективные трудности сбора материала и нерешенность многих таксономических проблем, вряд ли можно ожидать, что в ближайшее время будет реконструирована филогения голофилетической группы *Salvelinus* на основе полностью секвенированных последовательностей мтДНК. Наиболее рациональным представляется подход, основанный на RFLP анализе генов, объединенных в участки разной длины (Oleinik et al., 2007; Олейник, Скурихина, 2008). Применение универсальных праймеров, разработанных для мтДНК лососевых рыб (Gharrett et al., 2001), позволяет амплифицировать практически весь митохондриальный геном. В результате появляется возможность сравнить топологии деревьев, построенные для отдельных участков, с топологией дерева, построенного для объединенных данных по митохондриальному геному.

При выполнении данной части исследования, были поставлены следующие задачи, связанные с влиянием качественного состава дифференцирующих признаков на итоговую филогенетическую гипотезу. Во-первых, оценить сходство топологий деревьев, реконструированных для шести участков мтДНК, и степень их соответствия топологии дерева для максимального комплекса признаков; во-вторых, сравнить возможности выявления филогенетического сигнала по шести участкам мтДНК у близкородственных групп лососевых рыб. Выбранная схема анализа, реализованная для двух монофилетических родов лососевых рыб – *Salvelinus* (раздел 6.1) и *Oncorhynchus* (раздел 6.2), иллюстрирована 15 рисунками, которые объединяют 54 дендрограммы.

**6.3. Идентификация видов с помощью методов ДНК-штрихкодирования.** Методы молекулярной диагностики, получившие название ДНК-штрихкодирования или баркодинга, были предложены с целью точной и быстрой идентификации видов (Hebert et al., 2003; Hebert, Gregory, 2005). Однако в последнее время появляется все больше исследований, в которых результаты анализа последовательностей индивидуальных митохондриальных генов используются для выяснения филогенетических отношений. В данном разделе приводится анализ возможностей *COI*-баркодинга и объединенных последовательностей двух генов *Cyt b* и *COI* для реконструкции филогенеза лососевых рыб семейства Salmonidae. На основе обсуждения результатов исследований, включающих представителей лососевых рыб (Hubert et al., 2008; Crête-Lafrenière et al., 2012), получено подтверждение вывода, что таксон-признаковые матрицы для ДНК-штрихкодирования содержат слабый (или ограниченный) филогенетический сигнал из-за небольшого числа информативных признаков (DeSalle et al., 2005; Regier et al., 2008).

**6.4. Соответствие между “деревьями генов” и “деревьями видов” лососевых рыб семейства Salmonidae.** Результаты собственного исследования свидетельствуют, что для филогенетических групп *Salvelinus* и *Oncorhynchus* статистически устойчивые топологии генных деревьев не могут быть получены, вне зависимости от методов построения дендрограмм. Хорошее совпадение топологий с деревом для мтДНК рода *Salvelinus* наблюдается для участка *ND1/ND2*, несколько худшее – для участков *ND5/ND6*, *Cytb/D-loop*, *ND3/ND4L/ND4*, и слабое – для *COI/COII*, *A8/A6/COIII*. Наилучшее соответствие топологий получено для

комбинированного участка (*ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*). Поскольку данная топология совпадает не только по составу основных кластеров и последовательности дивергенции, но и по статистической поддержке узлов, вероятно, белок-кодирующие гены *ND1*, *ND2*, *ND5*, *Cyt b* и некодирующая *CR* область вносят максимальный вклад в суммарный филогенетический сигнал. Для группы тихоокеанских лососей наилучшее совпадение, полностью повторяющее топологию дерева для мтДНК рода *Oncorhynchus*, наблюдается для участка *ND1/ND2*. Хорошее совпадение топологий получено для участков *ND5/ND6*, *Cytb/D-loop*, среднее – для *ND3/ND4L/ND4*, *COI/COII*, и совсем слабое – для *A8/A6/COIII*.

Анализ собственных и литературных данных показывает, что оптимально информативные гены для исследованных групп позвоночных оказались разными. В качестве альтернативы гипотезе, постулирующей прямую зависимость вклада белок-кодирующих генов мтДНК в реконструкции от длины последовательности (Russo et al., 1996), предложено принять, что разрешающие возможности отдельных митохондриальных генов в филогенетических исследованиях основываются на оптимальной комбинации скорости мутаций анализируемого участка и уровня выявленного полиморфизма. Возможно, что одним из параметров, определяющих эффективность гена в филогенетическом анализе, является нуклеотидное разнообразие, поскольку по данному показателю наблюдается статистически значимое увеличение оценок для участков *ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6* в филогенетической группе *Salvelinus* – *Salmo*. Повышенную изменчивость у лососевых рыб двух выделенных информативных участков (*ND1/ND2*, *ND5/ND6*) подчеркивали разные авторы (Hansen, Loeschcke, 1996; Apostolidis et al., 1997; Churikov et al., 2001; Gharrett et al., 2001; Oleinik, Skurkhina, 2010; Олейник и др., 2010).

Для участка *A8/A6/COIII*, при достаточно высоких показателях изменчивости характерно максимальное соотношение количества филогенетически информативных сайтов к общему числу исследованных признаков. Поэтому, низкая эффективность участка *A8/A6/COIII* при реконструкции филогении группы *Salvelinus*, предположительно, определяется присутствием конфликтного филогенетического сигнала.

На основе собственных и литературных данных обосновывается необходимость использования участка *Cytb/D-loop* в филогенетических исследованиях лососевых рыб. Во-первых, лососевые рыбы относятся к таксонам, у которых средняя скорость нуклеотидных замещений некодирующей регуляторной области не превышает показателей для белок-кодирующих митохондриальных генов. Во-вторых, средняя скорость эволюции участка *Cytb/D-loop* приблизительно соответствует скорости эволюции индивидуальных генов, входящих в объединенную последовательность. В-третьих, нуклеотидный полиморфизм *CR* области достаточно эффективен для анализа филогеографических, популяционных и филогенетических связей между видами внутри одного рода.

Отличительной чертой консенсусных деревьев большинства индивидуальных генов является слабое разрешение, которое может быть связано с ложной политомией, основанной на отсутствии данных или нерепрезентативности выборки. В этом случае добавление в анализ признаков или таксонов может разрешить политомию, но для индивидуальных митохондриальных генов есть конечный предел числа признаков. Сравнительный анализ генных деревьев (*ND3*, *COIII*, *ND4L*, *ATPase6*, *12S* и *16S rRNA*, *Cyt b* и *COI*) филогенетических групп *Oncorhynchus* и *Salvelinus* показывает, что максимально возможного числа признаков оказывается

недостаточно, для получения устойчивых топологий с высокой поддержкой всех узлов. Поскольку малоэффективным оказывается и объединение таких генов в слитные последовательности (McKay, 1997; Crespi, Fulton, 2004; Dudu et al., 2011; Crête-Lafrenière et al., 2012), вероятно, что политомия генных деревьев в этом случае определяется слабым филогенетическим сигналом. В то же время, проблемы реконструкций по *CR* области в большей степени связаны с присутствием нефилогенетических сигналов, появляющихся в результате использования неадекватных эволюционных моделей или неправильного выбора внешней группы. В качестве эффективной стратегии уменьшения нефилогенетического сигнала без изменения подлинного филогенетического сигнала, наряду с оптимизацией эволюционной модели, обсуждается объем выборки, репрезентативный как в отношении таксономического состава, так и числа особей, представляющих каждый таксон.

Монофилетическая группа *Oncorhynchus* является идеальным модельным объектом для оценки разрешающей способности генетических маркеров и методов анализа (Олейник, 1994). Показано, что основным условием получения корректной топологии деревьев, при условии полного для данной группы представительства таксонов, а также необходимого и достаточного для описания структуры разнообразия количества признаков, является выбор маркера. Комбинированный набор сайтов, представляющих мтДНК, минимизирует отрицательные эффекты, связанные с мутационным насыщением и высоким уровнем гомоплазий для быстро эволюционирующих генов, а также недостаточного числа филогенетически информативных признаков для медленно эволюционирующих генов. Это позволяет сформулировать непротиворечивую филогенетическую гипотезу дивергенции тихоокеанских лососей.

Характерной особенностью топологий деревьев филогенетической группы *Salvelinus* является присутствие двух кластеров, в которых полифилетический состав гаплотипов поддерживается высокими статистическими оценками. В качестве причины слабого разрешения ветвей филогенетической группы (*S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae*, *S. andriashevi*) для деревьев коротких участков мтДНК предложено рассматривать истинную политомию, связанную с радиацией, которая сопровождается неполным расхождением митохондриальных линий по отдельным генам. Радиация является предпочтительным объяснением в этом случае, так как она коррелирует с расселением в новой адаптивной зоне. Кроме неразрешенной топологии такой сценарий предполагает также сходные оценки дивергенции между основными кладами. Монофилетическая группа (*S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae*, *S. andriashevi*) демонстрирует соответствие указанным параметрам описания.

В то же время, вторая филогенетическая группа (*S. m. malma*, *S. albus*, *S. schmidtii*, *S. kronocius*) формирует устойчивые кластеры гаплотипов на деревьях всех коротких участков мтДНК, но без поддержанной кластеризации гаплотипов согласно таксономической принадлежности. Проведенный генеалогический анализ гаплотипов мтДНК свидетельствует, что наблюдаемая картина, вероятно, является следствием сложного сочетания нескольких факторов (Oleinik, Skurikhina, 2010; Олейник и др., 2010). Однако на современном этапе разделить действие неполного расхождения линий и исторической интрогрессии, а также оценить величину потока генов у молодых таксонов, сохраняющих предковый полиморфизм, не представляется возможным (Funk, Omland, 2001; Holder et al., 2001; Bolnick, Fitzpatrick, 2007).

Выполненное исследование подвергает сомнению вывод, что хотя митохондриальные гены частично поддерживают филогенетические отношения некоторых лососевых рыб, уровень разрешения и устойчивость топологий для комбинированного анализа митохондриальных данных существенно ниже, чем для данных по ядерному геному (Phillips, Oakley, 1997; Crespi, Fulton, 2004). Также мы не считаем возможным согласиться с мнением, что в случае совместного анализа комбинированных ядерных и митохондриальных последовательностей, митохондриальные данные уменьшают силу филогенетического сигнала (Crespi, Fulton, 2004). Гораздо более обоснованной выглядит позиция исследователей (Yamanoue et al., 2008), считающих, что, так как митохондриальные гены кодируют ряд важнейших функций, связанных с аэробным обменом в митохондриях, возможно, что они накапливают меньше филогенетического шума, чем функционально специализированные ядерные гены.

Таким образом, в мтДНК лососевых рыб есть несколько генов (*ND1*, *ND2*, *ND5 Cyt b*) и некодирующая *CR* область, несущих максимальный филогенетический сигнал, и один наименее информативный ген (*ATPase6*). Результатом проведенного исследования является выбор комбинированного участка мтДНК (*ND1/ND2*, *Cytb/D-loop*, *ND5/ND6*) для анализа филогенетических отношений гольцов рода *Salvelinus*, в состав которого входят гены, характеризующиеся оптимальной комбинацией длины нуклеотидной последовательности, скорости мутаций и уровня исследованного полиморфизма. Однако гены *ND1*, *ND2* и *ND5* никогда не использовались для филогенетических реконструкций лососевых рыб. Вероятно, именно этот факт является причиной недооценки вклада мтДНК в суммарный филогенетический сигнал при исследовании молекулярной эволюции семейства Salmonidae (Crespi, Fulton, 2004). Очевидно, что если ставится задача филогенетического анализа таксонов, информация, заключенная в различных генах мтДНК, является взаимодополняющей. В этом случае репрезентативная выборка сайтов из разных участков лучше представляет изменчивость генома в целом, чем смежные сайты секвенированных последовательностей одного гена.

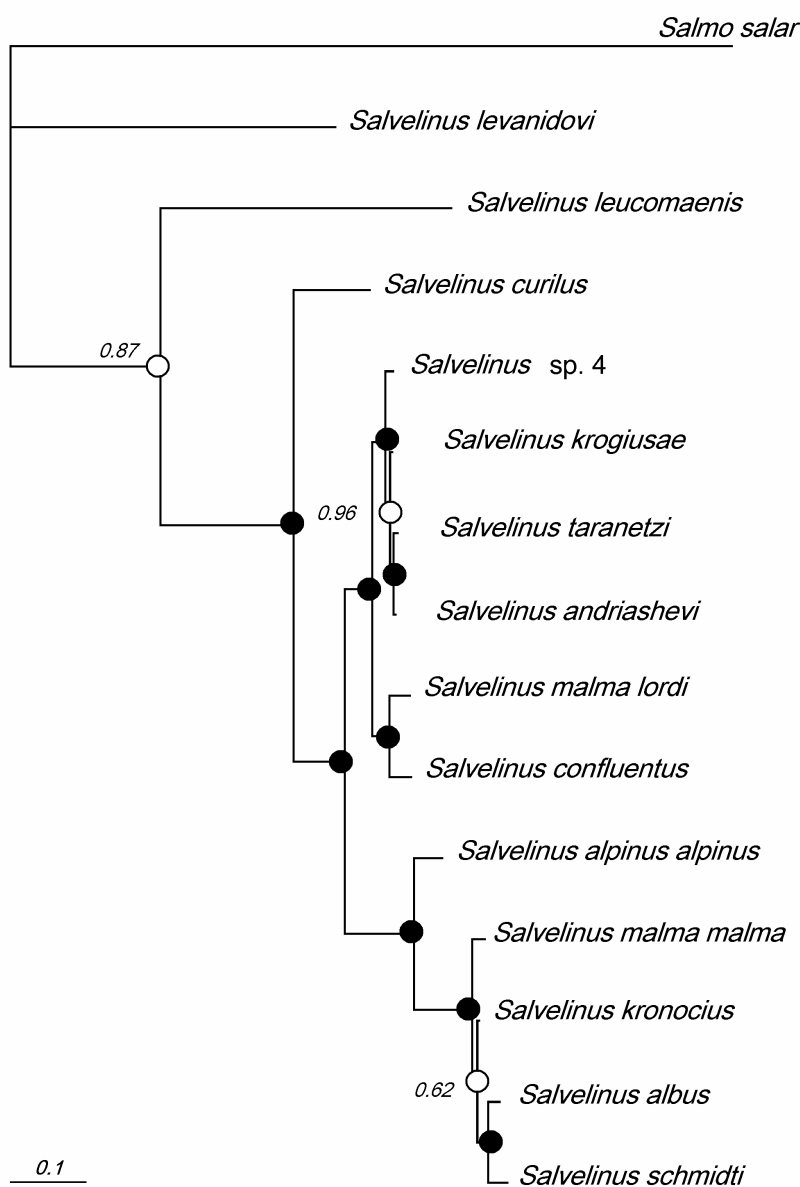
## Глава 7. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ГОЛЬЦОВ РОДА *SALVELINUS*

В главе рассмотрены наиболее актуальные, по мнению автора, проблемы филогенетики и таксономии рода *Salvelinus*, связанные с результатами современных молекулярно-генетических исследований гольцов.

**7.1. Проблема выделения подродовых таксонов гольцов.** Согласно морфологическим и кариологическим данным, сформировалось консенсусное мнение, что гольцы таксономически разделяются на подроды *Baione*, *Cristivomer*, *Salvelinus* (Behnke, 1980, 1989). При этой трактовке *Salvelinus fontinalis* (*Baione*) и *Salvelinus namaycush* (*Cristivomer*) являются самостоятельными филогенетическими линиями, дивергировавшими от общего предка рода. Реконструкции филогенетических отношений гольцов на основе молекулярно-генетических маркеров не позволили однозначно ответить на вопрос о взаимоотношениях базальных ветвей, так как на многих дендрограммах *S. fontinalis* и *S. namaycush* образовывали сестринскую группу (Phillips, Oakley, 1997; Crespi, Fulton, 2004; Шубина и др., 2006) или кластеризовались с таксонами, принадлежащими к подроду *Salvelinus* (Brunner et al., 2001; Westrich et al., 2002; Crespi, Fulton, 2004; Шубина и др., 2006; Taylor et al., 2008; Crête-Lafrenière et al., 2012). Было предложено несколько таксономических

решений, одно из которых разделяет род *Salvelinus* на три подрода: 1) *Salvethymus* с одним видом *Salvethymus svetovidovi*; 2) *Baione*, с двумя видами *Salvelinus fontinalis* и *Salvelinus namaycush*; 3) *Salvelinus* (Nelson, 1994, 2006). Одновременно отстаивались противоположные позиции, согласно которым: 1) *S. fontinalis* и *S. namaycush* следует рассматривать в рамках рода *Salvelinus* (Шубина и др., 2006); 2) не существует оснований для выделения любых надвидовых таксонов гольцов (Глубоковский, 1995).

В разделе обсуждаются два взаимосвязанных аспекта проблемы. Один из них касается установления соответствия между уровнем дивергенции независимо эволюционирующих филогенетических линий гольцов и их возможным таксономическим статусом. Второй связан с рассмотрением возможных причин кластеризации базальных ветвей на дендрограммах, полученных для комплексов качественно различных признаков. Сравнительный



анализ свидетельствует, что основная филогенетическая проблема заключается в самом таксономическом составе рода *Salvelinus*, объединяющего группу близкородственных слабо дивергировавших таксонов, и несколько видов, генетически удаленных друг от друга и от компактной группы гольцов. В итоге, для такого состава таксонов, конфликт между топологиями генных деревьев определяют высокий уровень дивергенции (табл. 2) и неравная длина ветвей (рис. 11). При этом все топологии, с большой вероятностью, будут предрасположены к эффекту притяжения длинных базальных ветвей (Felsenstein, 1978; Hendy, Penny, 1989). Однако поскольку обсуждаемая группа таксонов, кроме *S. fontinalis* и *S. namaycush*, включает также *S. levanidovi* и *S. leucomaenis*, то логичнее рассматривать все виды рода *Salvelinus* в равном таксономическом ранге.

**Рис. 11.** Филогенетические отношения гольцов рода *Salvelinus*: топология и длины ветвей филограммы (BI, модель F84). Внешняя группа *Salmo salar*. Узлы с максимальной статистической поддержкой ( $PP > 0.98$ ) обозначены черным кружком, с умеренной поддержкой – светлым. По шкале – число нуклеотидных замен на сайт.

Анализ молекулярно-генетических исследований *Salvethymus svetovidovi* (Brunner et al., 2001; Elz, 2003; Шубина и др., 2006; Taylor et al., 2008; Crête-Lafrenière et al., 2012) однозначно указывает на самостоятельный таксономический статус *Sv. svetovidovi* в рамках рода *Salvelinus*, не подтверждая филогенетические гипотезы, постулирующие раннюю дивергенцию ветви *Salvethymus* от общего предка гольцов (Stearley, Smith, 1993; Глубоковский, 1995).

Таким образом, комплексный анализ собственных и опубликованных данных свидетельствует, что гольцы рода *Salvelinus* (включая *Salvethymus svetovidovi*) являются монофилетической группой, дивергировавшей от общего предка. Установлено, что спецификой рода *Salvelinus*, является объединение таксонов, с филогенетическими проблемами разной степени сложности. Первая группа включает таксоны с высокой дивергенцией и длинными ветвями (*S. fontinalis*, *S. namaycush*, *S. levanidovi*, *S. leucomaenis*), вторая – остальные таксоны с невысокой дивергенцией, формирующие короткие внутренние ветви на деревьях. Поэтому общую топологию дендрограмм рода *Salvelinus* следует охарактеризовать как сложную, с длинными внешними и короткими внутренними ветвями, неустойчивую к эффекту притяжения длинных ветвей при филогенетических реконструкциях. В итоге, кластеризация базальных ветвей с большей степенью вероятности представляет нефилогенетический сигнал, и, таким образом, не может интерпретироваться как отношения монофилетических групп.

**7.2. Парафилия мтДНК *S. confluentus*.** На основе филогеографического и филогенетического анализов было обнаружено, что митохондриальный геном *S. confluentus* содержит две филогенетические группы ('*coastal*' и '*interior*') с разной географической локализацией и границей, проходящей по Береговому хребту и Каскадным горам (Taylor et al., 1999, 2001; Redenbach, Taylor, 2002; Elz, 2003; Ardren et al., 2011). Поскольку подобное разделение также присутствует и у других таксонов рыб, то общее направление дивергенции на прибрежные и внутренние митохондриальные линии на одной территории предполагает существование у *S. confluentus* двух ледниковых рефугиумов.

Одновременно филогенетический анализ, выполненный для *S. m. malma*, *S. m. lordi* и *S. confluentus*, показал, что *S. confluentus* является парафилетическим относительно *S. m. lordi* по митохондриальным генам, и монофилетическим относительно *S. m. lordi* и *S. m. malma* по ядерным генам (Taylor et al., 1999, 2001; Redenbach, Taylor, 2002; Elz, 2003). По мнению исследователей, наблюдаемая парафилия митохондриальных линий, наиболее вероятно, может быть связана с исторической интрогрессивной гибридизацией, распространенной у гольцовых рыб (Taylor et al., 1999, 2001; Redenbach, Taylor, 2002).

Согласно итоговой филогенетической гипотезе, *S. confluentus* и *S. m. lordi* не были полностью изолированы во время позднеплейстоценового (висконсинского) ледникового периода. Предполагается (Redenbach, Taylor, 2002), что исторической областью симпатрии являлся рефугиум в долине реки Чехалис, в котором сохранялись предковые популяции нескольких видов рыб (McPhail, 1967; McPhail, Taylor, 1999; Taylor et al., 1999). Однако, несмотря на реалистичность, предложенный сценарий содержит некоторые противоречия, критически представленные в данном разделе, в первую очередь касающиеся времени предполагаемого акта интрогрессии.

Очевидно, что необходим более широкий совместный филогеографический анализ распределения гаплотипов мтДНК *S. confluentus* и *S. m. lordi*, включающий как территории предполагаемых рефугиумов, так и вероятные области возникновения

видов, в которых можно ожидать присутствия предковых филетических линий (гаплотипов) обоих видов. При этом следует учитывать новый взгляд на отношения основных филогенетических групп гольцов, согласно которому сестринская группа *S. confluentus* и *S. m. lordi* дивергировала от общего предка арктической филогенетической группы *S. taranetzi*.

**7.3. Полифилия и парафилия мтДНК *S. alpinus*.** Реконструкция филогенетических отношений гольцов рода *Salvelinus* не подтвердила монофилетические отношения между основными филогруппами мтДНК *S. alpinus* (Behnke, 1980, 1984), поскольку предполагается их происхождение от разных предковых филетических линий (Grewe et al., 1990; Brunner et al., 2001; Малярчук, 2002; Elz, 2003; Oleinik et al., 2007; Alekseyev et al., 2009; Yamamoto et al., 2012). *S. a. alpinus*, *S. a. salvelinus* (евразийская группа) и *S. a. oquassa* (канадская группа) образуют монофилетическую группу с берингийской группой *S. m. malma*, а арктическая группа *S. taranetzi* и *S. a. erythrinus* с восточной тихоокеанской группой *S. confluentus* и *S. m. lordi*. В результате, если рассматривать их в рамках одного вида (даже полнокомплексного *S. alpinus* complex), то образуется парафилетическая группировка.

По нашему мнению, в случае с филогруппами *S. alpinus* основные причины парафилии могут заключаться в противоречиях, связанных, во-первых, с представлениями о таксономическом ранге гольца Таранца и его родственных отношениях с арктическим гольцом, во-вторых, с нерешенной проблемой взаимоотношений *S. taranetzi* Азии и *S. a. erythrinus* Северной Америки.

В результате критического обзора литературных источников, сделан вывод, что если принять во внимание многочисленные филогенетические сигналы о единстве популяций гольца Таранца Азии и *S. a. erythrinus* Северной Америки (арктическая филогенетическая группа), то проблема парафилии *S. alpinus* для филогении мтДНК перестает существовать, поскольку *S. taranetzi* является самостоятельным таксоном видового ранга. Отметим, что, предполагая идентичность *S. taranetzi* и популяций *S. a. erythrinus* Северной Америки, мы не отрицаем существование между ними определенного уровня дивергенции, вследствие вероятной фрагментации ареала и последующей эволюции в условиях изоляции расстоянием. В то же время, *S. a. alpinus*, *S. a. salvelinus* и *S. a. oquassa* образуют близкородственную группу, монофилия которой подтверждается всеми генетическими маркерами (Grewe et al., 1990; Danzmann et al., 1991; Phillips, Pleyte, 1991; Wilson et al., 1996; Brunner et al., 2001; Осинов, 2001; Elz, 2003; Taylor et al., 2008; Alekseyev et al., 2009). Достаточно близкую к такому взгляду позицию занимают исследователи, считающие, что *S. alpinus*, вероятнее всего, состоит из нескольких, географически соприкасающихся видов (Taylor et al., 2008).

**7.4. Полифилия и парафилия мтДНК *S. malma*.** Исследование филогеографии мальмы на большей части ареала выявило три филогенетические группы гаплотипов мтДНК, которые соответствуют трем предполагаемым подвидам: *S. m. malma*, *S. m. krascheninnikovi* и *S. m. lordi* (Олейник и др., 2005, 2010, 2011; Oleinik et al., 2004, 2007; Yamamoto et al., 2012). Подтверждена генетическая идентичность *S. m. malma* Азии и Северной Америки (Oleinik et al., 2004; Олейник и др., 2005, 2010). Также показано, что популяции мальмы южного Приморья, Сахалина и северной Японии идентичны и относятся к *S. m. krascheninnikovi* (Олейник и др., 2010). В то же время, реконструкция филогенетических отношений гольцов рода *Salvelinus* не подтвердила монофилетические отношения между основными филогруппами мтДНК *S. malma*

(Oleinik et al., 2007; Yamamoto et al., 2012). Полученные результаты свидетельствуют не только о значительной дивергенции между подвидами, и предполагают их происхождение от разных предковых филетических линий. *S. m. krascheninnikovi* дивергировала от общего предка рода на ранних этапах эволюции. *S. m. malma* образует монофилетическую группу с *S. alpinus*, а *S. m. lordi* – с *S. confluentus*. В результате, если рассматривать их в рамках одного вида, то образуется парафилетическая группировка.

В разделе дан критический обзор взглядов, связывающих отсутствие монофилии митохондриальных линий *S. malma* исключительно с исторической гибридизацией, совмещенной с интрогрессией митохондриальных генов (Phillips et al., 1999; Redenbach, Taylor, 2002; Шедько и др., 2007). В результате обсуждения сделан вывод, что альтернативным объяснением является нерешенность таксономических проблем и продолжающиеся дискуссии о взаимоотношениях между *S. malma* и *S. alpinus*, которые трансформировались в отношения между *S. malma* complex и *S. alpinus* complex или внутри *S. alpinus* – *S. malma* complex. В то же время, многочисленные исследования (Phillips et al., 1995, 1999; Фролов, 2000; Redenbach, Taylor, 2002; Elz, 2003; Олейник и др., 2005; Oleinik et al., 2007; Салменкова и др., 2009; Yamamoto et al., 2012) указывают на то, что подразделенность на подвиды (или даже географические формы) скрывает подлинную глубину дивергенции внутри *S. malma*. Предполагаемые подвиды различаются по комплексу морфологических признаков, структуре кариотипов, аллозимным и микросателлитным локусам ядерной ДНК. При этом степень генетической дивергенции между *S. m. malma*, *S. m. krascheninnikovi* и *S. m. lordi* значительно превосходит оценки как между симпатричными, так и аллопатричными популяциями каждого из таксонов (Олейник и др., 2005), или межпопуляционную дивергенцию *S. alpinus* (Oleinik et al., 2007).

Реконструкция филогении рода *Salvelinus* выявила парафилетичность видов *S. alpinus* и *S. malma*, которые объединяют таксоны, дивергировавшие в разное время и от разных предковых митохондриальных линий. Альтернативой объединения в полнокомплексный вид *S. alpinus* – *S. malma* complex является переосмысление содержания соответствующих таксонов и разделения их на несколько видов. С этих позиций, в качестве самостоятельных видов можно рассматривать *S. alpinus*, *S. taranetzi*, *S. malma*, *S. curilus*, *S. lordi*, формирующих на филограмме монофилетические группы (*S. alpinus*, *S. malma*), (*S. taranetzi* (*S. confluentus*, *S. lordi*)) и самостоятельную филогенетическую группу *S. curilus*.

**7.5. Проблема таксономических взаимоотношений мальмы и арктического гольца.** В последние годы обсуждаемая проблема вновь стала актуальной в связи с появлением генетических данных, противоречащих представлению о *S. malma* как валидном таксоне видового уровня (Brunner et al., 2001; Шубина и др., 2006). Так как *S. alpinus* имеет более широкое распространение, и был описан раньше, эти результаты предполагают, что мальму следует рассматривать как подвид в рамках *S. alpinus* complex (Шубина и др., 2006) или один из многих географических изолятов арктического гольца (Brunner et al., 2001). Это соответствует представлениям о конспецифичности мальмы и арктического гольца *S. alpinus* complex (Савваитова, 1989).

Однако были выдвинуты гипотезы, связывающие отсутствие реципрокной монофилии с тем, что *S. malma* и *S. alpinus* не являются действительными сестринскими таксонами, а состоят из нескольких видов (Oleinik et al., 2007; Taylor et al., 2008). По мнению Э. Тейлора с соавторами (Taylor et al., 2008), *S. m. malma*,



эволюционирующая в Северной Пацифике, вероятно, относительно недавно дивергировала от локальной берингийской филогенетической группы, представляющей неописанный вид внутри *S. alpinus*. Согласно результатам филогеографического и кладистического анализов мтДНК, берингийская филогенетическая группа *S. m. malma* дивергировала от общего предка с евразийской филогруппой, таксономически соответствующей *S. alpinus* (Oleinik et al., 2007). В то же время, из филограммы также следует, что *S. taranetzi* представляет вместе с близкородственными таксонами самостоятельную арктическую филетическую линию, дивергирующую от общего предка раньше, чем происходит разделение *S. m. malma* и *S. alpinus* (рис. 10). Результаты проведенного исследования и анализа литературных данных позволяют утверждать, что видовой статус *S. m. malma* относительно арктической филогенетической группы *S. taranetzi*, не вызывает сомнения. На основе филогеографического и филогенетического анализов получены доказательства строгой генетической дифференциации и отсутствия потока генов между симпатричными популяциями *S. m. malma* и таксонами, объединенными в арктическую группу (Картавцев и др., 1983; Омельченко, Салменкова, 1998; Омельченко и др., 1998; Salmenkova et al., 2000; Олейник и др., 2004; Олейник, Скурихина, 2007).

Применительно к таким сложным таксономическим группам, как гольцы, наиболее взвешенной представляется позиция исследователей, предлагающих использовать комплексный подход к выделению видов (Глубоковский, 1995; Dayrat, 2005; Абрамсон, 2009). В рамках этого подхода сделан вывод, что валидность морфологических видов мальмы и арктического гольца подтверждается несколькими независимыми критериями. Для симпатричных популяций это, в первую очередь, репродуктивная изоляция (Taylor et al., 2008), наличие фенотипического хиатуса по простым и комплексным морфологическим признакам (McPhail, 1961; Armstrong, Morrow, 1980; Morrow, 1980; Глубоковский, 1995), экологическая и этологическая обособленность (Reist, Sawatzky, 2010). Аллопатричные популяции разделяются на основании типологического критерия, предполагающего существование видоспецифических признаков, мономорфных у данного вида (Morrow, 1980; Taylor et al., 2008; Kowalchuk et al., 2010), популяционного критерия пороговых различий (Salmenkova et al., 2000; Омельченко, 2005; Oleinik et al., 2007), и критерия филетических взаимоотношений (Oleinik et al., 2007). Следовательно, подтверждается точка зрения, согласно которой *S. malma* (*S. m. malma*), *S. alpinus* и *S. taranetzi* являются независимо эволюционирующими видами (Глубоковский и др., 1979; Глубоковский, Черешнев, 1981; Черешнев, 1982), формирующими самостоятельные филетические линии гольцов (Oleinik et al., 2007).

**7.6. Соответствие таксономической дифференциации гольцов рода *Salvelinus* по результатам морфологического и генетического анализов.** Сопоставление результатов морфологических и генетических исследований свидетельствует, что дивергенция генетических филогенетических групп не полностью отражает величину фенотипического и экологического полиморфизма гольцов рода *Salvelinus*. Основные противоречия связаны с генетическим подтверждением таксономической подразделенности гольцов 1) Центральной Сибири, принадлежащих к евразийской филогенетической группе *S. alpinus*; 2) берингийской филогенетической группы *S. m. malma* из бассейна озера Кроноцкого и реки Камчатка; 3) арктической филогенетической группы *S. taranetzi*; 4) филогенетической группы *S. leucotaenis*. В разделе рассмотрены два аспекта

обсуждаемой проблемы. Первый аспект касается крайне низкого уровня генетической дивергенции между морфологически хорошо дифференцируемыми таксонами гольцов, второй – отсутствия связи между дифференциацией, основанной преимущественно на морфологических признаках, и генетической дивергенцией.

Объективная причина наблюдаемого несоответствия морфологической и генетической дифференциации может быть связана с неравномерностью эволюционной динамики качественно разных признаков (Глубоковский, 1995; Brunner et al., 2001; Yamamoto et al., 2004; Oleinik et al., 2007; Oleinik, Skurikhina, 2010). Возможно, наиболее ярким примером адаптации в условиях изолированного озера является длинноперая паляя *Salvelinus svetovidovi*, обладающая уникальным сочетанием морфологических особенностей, вероятно, появившихся в результате глубоко зашедшей специализации (Stearley, Smith, 1993; Черешнев и др., 2002), не совпадающей с генетической дивергенцией (Brunner et al., 2001; Crête-Lafrenière et al., 2012).

Для объяснения низкой дивергенции внутри *арктической* группы (*S. taranetzi*, *Salvelinus* sp. 4, *S. krogiusae*, *S. andriashevi*) нами было предложено рассмотреть модель быстрого видообразования, совмещенного с расселением в новой адаптивной зоне. Однако внутри остальных перечисленных выше филогенетических групп даже самые быстро эволюционирующие маркеры, такие как микросателлитные локусы и короткие повторяющиеся последовательности (SINEs), не всегда решают проблему дифференциации между молодыми таксонами гольцов (Hamada et al., 1998; Yamamoto et al., 2004; Салменкова и др., 2009).

При обсуждении второго, выделенного выше, аспекта проблемы отмечается, что в нескольких филогенетических группах гольцовых рыб не наблюдается дифференциации, соответствующей предполагаемой таксономической принадлежности (Yamamoto et al., 2004; Радченко и др., 2006; Alekseyev et al., 2009; Oleinik, Skurikhina, 2010; и др.). Сравнительный анализ собственных и литературных данных позволил предположить, что в основе наблюдаемого конфликта между морфологической и генетической дифференциацией лежат объективные причины. Поскольку для гольцов высока возможность параллельного и конвергентного возникновения идентичных морфо- и экотипов в процессе самостоятельной эволюции в аллопатрии, то современная систематика рода, основанная на гомопластичных морфологических и экологических признаках, вероятно, не полностью отражает филогенетические взаимоотношения.

## ВЫВОДЫ

1. Митохондриальная ДНК является эффективным молекулярным маркером для реконструкции филогенетических отношений между видами и филогенетическими группами лососевых рыб семейства Salmonidae, анализа микроэволюционных процессов на внутривидовом уровне (дивергенция, дифференциация, историческая демография популяций), при условии использования репрезентативного комплекса признаков.

2. Филогенетическая информация, заключенная в различных генах мтДНК, является взаимодополняющей. Для родов *Salvelinus* и *Oncorhynchus* статистически устойчивые топологии не могут быть получены при анализе отдельных генов или коротких участков мтДНК, вне зависимости от эволюционных моделей и методов построения дендрограмм. Установлены участки митохондриального генома (*ND1*,

*ND2, ND5, Cyt b, CR* область), несущие максимальный филогенетический сигнал о филогенезе лососевых рыб.

3. Спецификой рода *Salvelinus*, является существование двух групп таксонов, с филогенетическими проблемами разной степени сложности. Первая группа объединяет таксоны с высокой дивергенцией и длинными внешними ветвями (*S. fontinalis, S. namaycush, S. levanidovi, S. leucomaenis*), вторая – все остальные таксоны с невысокой дивергенцией, формирующие короткие внутренние ветви на дендрограммах. Общую топологию дендрограмм рода следует охарактеризовать как сложную, неустойчивую к эффекту притяжения длинных базальных ветвей при филогенетических реконструкциях.

4. Гольцы рода *Salvelinus* (включая *Salvethymus*) являются монофилетической группой лососевых рыб, дивергировавшей от общего предка, без разделения на подродовые таксоны. В филогенезе рода прошло четыре цикла дивергенции митохондриального генома. Первый относится к позднему миоцену (6–4 млн лет назад) и связан с последовательной дивергенцией базальных ветвей *S. fontinalis, S. namaycush, S. levanidovi* и *S. leucomaenis*. На период 3–2 млн лет назад приходится два дивергентных события: обособление предковой линии *S. curilus* (*S. m. krascheninnikovi*) и последующее разделение общего предка рода на два митохондриальных филума, объединяющих независимо эволюционирующие таксоны гольцов. Третий цикл относится к временному отрезку около 1 млн лет назад (ранний плейстоцен) и включает дивергенцию обоих филумов. В одном филуме сравнительно быстро произошло обособление *арктической* и *восточной тихоокеанской* филогрупп, и дивергенция общего предка последней на *S. confluentus* и *S. m. lordi*. Другой филум в это же время дивергировал на филогенетические группы *S. m. malma* и *S. alpinus*. На последнем этапе, в среднем – позднем плейстоцене, происходила дифференциация таксонов внутри филогенетических групп.

5. Дисперсалистская модель расселения из аллопатрических рефугиумов объясняет внутривидовую дифференциацию у двух таксонов гольцов (*S. m. malma* и *S. m. krascheninnikovi*). Географическое распространение гаплотипов мтДНК сравниваемых таксонов определялось различной комбинацией исторических демографических событий (расширение и фрагментация ареалов) и генетических процессов, действующих в современных популяциях. Особенности популяционной дифференциации *S. m. malma* обусловлены событиями, сопровождавшими смену периодов оледенений и межледниковья в плейстоцене. В то же время, самостоятельная дивергенция *S. m. krascheninnikovi* связана с циклическими процессами геологического формирования бассейна Японского моря и прилегающих территорий.

6. Наличие в эволюционной истории гольцов рефугиальных стадий связано с глобальными циклическими геологическими и климатическими изменениями в позднем кайнозое, приводивших к фрагментациям ареалов. В такие критические периоды происходила реорганизация генетической структуры изолятов в рефугиумах под действием отбора и случайного дрейфа генов, что создавало необходимые генетические предпосылки для видообразования. Сравнительное изучение мтДНК показало, что основными факторами возникновения биоразнообразия гольцов рода *Salvelinus* на территориях северо-восточной Азии были пространственная изоляция и различия конкретных биоценозов, в которых проходила самостоятельная эволюция дивергировавших популяций.

7. Для гольцов рода *Salvelinus* обосновано существование двух эволюционных моделей формирования исследованных бимодальных зон симпатрии, опирающихся на гипотезу аллопатрического видообразования. Присутствие симпатрических популяций связано с вторичным контактом предков значительно дивергировавших филетических линий, а также с множественными вселениями представителей близкородственных филетических линий, дивергенция которых произошла в разных рефугиумах. Филогеографический анализ позволил понять роль исторических событий, приведших к возникновению в некоторых изолированных озерных экосистемах эндемичных видов гольцов.

8. Современная систематика рода *Salvelinus*, объединяющая в рамках полнокомплексного вида *Salvelinus alpinus* – *Salvelinus malma* complex большую часть таксонов гольцов, вероятно, не полностью отражает филогенетические взаимоотношения, поскольку основана на гомопластичных морфологических и экологических признаках. Альтернативой объединения в полнокомплексный вид является переосмысление содержания таксонов и разделения их на несколько видов (*S. alpinus*, *S. taranetzi*, *S. malma*, *S. curilus*, *S. lordi*), соответствующих монофилетическим группам.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Олейник А.Г., Полякова Н.Е. Генетическая дифференциация и филогения лососевых рыб сем. Salmonidae // Генетика. 1992. Т. 28, № 9. С. 141–149.
2. Скурихина Л.А., Олейник А.Г., Невшупов С.В., Брыков Вл.А. Филогения дальневосточных лососевых рыб по данным рестриктазного анализа ядерной ДНК // Генетика. 1993. Т. 29, № 9. С. 1508–1518.
3. Олейник А.Г. Филогения лососевых рыб сем. Salmonidae по данным рестриктазного анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 1994. Т. 30, № 11. С. 1458–1465.
4. Олейник А.Г., Полякова Н.Е. Рестриктазный анализ митохондриального генома лососевых рыб сем. Salmonidae // Генетика. 1994. Т. 30, № 9. С. 120–21214.
5. Олейник А.Г. Молекулярная филогения лососевых рыб: соответствие результатов анализа ядерной и митохондриальной ДНК // Генетика. 1997. Т. 33, № 2. С. 229–234.
6. Олейник А.Г., Скурихина Л.А. Родственные взаимоотношения проходных гольцов рода *Salvelinus* (Salmonidae, Salmoniformes) по данным рестриктазного анализа ядерной ДНК // Генетика. 1999. Т. 35, № 9. С.1258–1268.
7. Олейник А.Г., Скурихина Л.А. О родственных взаимоотношениях проходных гольцов рода *Salvelinus* по данным рестриктазного анализа ядерной ДНК // Доклады Академии Наук. 1999. Т. 364, № 5. С. 711–713.
8. Олейник А.Г. О темпах эволюции митохондриального и ядерного геномов лососевых лососевых рыб сем. Salmonidae // Биология моря. 2000. Т. 26, № 6. С. 410–416.
9. Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков Вл.А., Фролов С.В., Черешнев И.А. Дивергенция митохондриальной ДНК двух подвидов мальмы *Salvelinus malma* (Salmonidae: Pisces) // Доклады РАН. 2001. Т. 367, № 6. С. 844–846.
10. Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков Вл.А. Дивергенция мальмы *Salvelinus malma* в азиатской части Северной Пацифики по данным PCR-RFLP анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2002. Т. 38, № 10. С. 1393–1401.

11. **Олейник А.Г.**, Скурихина Л.А., Брыков Вл.А. Генетическая дифференциация трех симпатричных видов гольцов рода *Salvelinus* по данным PCR-RFLP анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2003. Т. 39, № 8. С. 1099–1105.
12. **Олейник А.Г.**, Скурихина Л.А., Брыков Вл.А. Дифференциация мальмы *Salvelinus malma* и гольца Таранца *Salvelinus taranetzi* по данным PCR-RFLP анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2004. Т. 40, № 3. С. 386–392.
13. **Олейник А.Г.**, Скурихина Л.А., Брыков Вл.А., Крэйн П.А., Венбург Дж.К. Дифференциация мальмы *Salvelinus malma* Азии и Северной Америки по данным PCR-RFLP анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2005. Т. 41, №5. С. 626–634.
14. **Олейник А.Г.**, Скурихина Л.А. Генетическая дивергенция симпатричных гольцов рода *Salvelinus* из озера Начикинское (Камчатка) // Генетика. 2007. Т. 43, № 8. С. 1097–1106.
15. **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.
16. **Олейник А.Г.**, Скурихина Л.А. Филогенетические связи сахалинского тайменя *Parahucho perryi* по данным PCR-RFLP анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2008. Т. 44, № 7. С. 885–895.
17. **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.
18. **Олейник А.Г.**, Скурихина Л.А., Брыков Вл.А. Генетическая дивергенция митохондриальной ДНК белого гольца *Salvelinus albus* и северной мальмы *Salvelinus malma malma* // Генетика. 2010. Т. 46, № 3. С. 389–400.
19. Брыков Вл.А., **Олейник А.Г.**, Полякова Н.Е., Скурихина Л.А., Семина А.В., Подлесных А.В., Кухлевский А.Д. Неравномерность дивергентной эволюции у рыб Северной Пацифики // Генетика. 2010. Т. 46, № 7. С. 967–973.
20. **Олейник А.Г.**, Скурихина Л.А., Брыков Вл.А. Популяционно-генетическая структура северной мальмы *Salvelinus malma malma* Азии и Северной Америки // Генетика. 2011. Т. 47, № 12. С. 1642–1654.
21. **Oleinik A.G.**, Skurikhina L.A., Frolov S.V., Brykov V.A., Chereshnev I.A. Differences between two subspecies of Dolly Varden, *Salvelinus malma*, revealed by RFLP-PCR analysis of mitochondrial DNA // Environmental Biology of Fishes. 2004. V. 69, № 1–4. P. 449–459.
22. **Oleinik A.G.**, Skurikhina L.A., Brykov V.A. Divergence of the *Salvelinus* species mitochondrial DNA from northeastern Asia // Ecology of Freshwater Fish. 2007. V. 16, № 1. P. 87–98.
23. **Oleinik A.G.**, Skurikhina L.A. Mitochondrial DNA diversity and relationships of endemic charrs of the genus *Salvelinus* from lake Kronotskoye (Kamchatka Peninsula) // Hydrobiologia. 2010. V. 650, № 1. P. 145–159.
24. Gordeeva N.V., Chukova E.I., **Oleinik A.G.** Microsatellite genetic variation of Asian populations of Dolly Varden charr // Hydrobiologia. 2010. V. 650, № 1. P. 133–144.

#### Статьи, опубликованные в других изданиях:

25. **Oleinik A.G.** Salmonid's molecular phylogeny: data congruence from nuclear and mitochondrial DNA // Bridges of Science Between North America and the Russian Far East: Proceedings of the 45th Arctic Science Conference: 25–27 August, 1994, Anchorage, Alaska, 29 August – 2 September, 1994, Vladivostok, Russia / Eds. R.H. Meehan, V.

Sergienko, G. Weller. Vladivostok: Far East Branch, Russian Academy of Sciences, 1994. P. 112–116.

**Работы, опубликованные в материалах всесоюзных, всероссийских и международных конференций:**

26. **Oleinik A.G.** Molecular systematics of fish of the family Salmonidae // Bridges of sciences between North America and Russian Far East: Proceedings of the 45th Arctic Science Conference. Vladivostok: Dalnauka, 1994. P. 129.
27. **Олейник А.Г.** Количественный анализ влияния начальных условий описания таксонов на результаты филогенетических реконструкций в сем. Salmonidae // Систематика, биология и биотехника разведения лососевых рыб: Тезисы Всесоюзного совещания по лососевидным. СПб., 1994. С.144–146.
28. **Олейник А.Г.** Направление и темпы молекулярной эволюции лососевых рыб // Первый конгресс ихтиологов России: тезисы докладов, Астрахань, сентябрь 1997 г. М.: ВНИРО, 1997. С. 22.
29. **Oleinik A.G., Skurikhina L.A.** Phylogenetic relationships among anadromous chars of the genus *Salvelinus* based on restriction endonuclease analysis of nuclear DNA // Biology and Evolution of Chars of the Northern Hemisphere: Abstracts of the ISACF Workshop. Kamchatka, Russia, September 2–10, 1998. Vladivostok: Dalnauka, 1998. P. 27.
30. **Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Brykov V.I.A., Crane P.A., Wenburg J.K.** Phylogeography of the Dolly Varden char *Salvelinus malma* of Asia and North America // Bridges of science between North America and the Russian Far East: Past, present and future: Proceedings of an International Scientific Conference on the Arctic and North Pacific. Vladivostok, Russia, September 14–16, 2004. Vladivostok: Dalnauka, 2004. P. 92.
31. **Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков В.А.** Молекулярная эволюция гольцов рода *Salvelinus* по данным PCR-RFLP анализа митохондриальной ДНК // Современные проблемы биологической эволюции: Материалы конференции к 100-летию Государственного Дарвиновского музея. Москва, 17–20 сентября 2007 г. М.: Изд-во ГДМ, 2007. С. 146–148.
32. **Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Brykov V.I.A.** Dolly Varden charr: phylogeography, genetic differentiation and origin, based on PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA // Proceedings of the International Scientific Conference “Computational Phylogenetics and Molecular Systematics, CPMS' 2007”. Moscow, Russia, November 16–19, 2007. М.: КМК Scientific Press, 2007. P. 226–228.
33. **Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков В.А.** Проблемы генетического разнообразия и эволюции 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. 19–20.
34. **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.
35. **Oleinik A.G., Skurikhina L.A.** Mitochondrial DNA diversity and relationships of endemic chars of the genus *Salvelinus* from lake Kronotskoye (Kamchatka Peninsula) // 6th

International Charr Symposium, June 15-18, 2009, Stirling, Scotland: Abstracts of Poster Presentations. Stirling, Scotland, 2009. P. 22.

36. Chukova E.I., Gordeeva N.V., **Oleinik A.G.** Microsatellite genetic variation of Asian populations of Dolly Varden charr // 6th International Charr Symposium, June 15–18, 2009, Stirling, Scotland: Abstracts of Poster Presentations. Stirling, Scotland, 2009. P. 4.

37. **Олейник А.Г.**, Скурихина Л.А., Брыков В.А. Филогенетические отношения и эволюция митохондриальной ДНК гольцов рода *Salvelinus* // V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 21–28 июня 2009 г.): Тезисы докладов. М., 2009. Ч. 2. С. 296.

38. 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.

39. **Oleinik A.G.**, Skurikhina L.A., Brykov V.I.A. Genetic differentiation and phylogeography of northern Dolly Varden, *Salvelinus malma malma* (Salmonidae), from northeastern Asia and northwestern North America // Proceedings of the International Scientific Conference “Problem of Population and General Genetics”. Moscow, November 14–16, 2011. М.: “Cifrovichok LTD”, 2011. P. 80.

40. **Oleinik A.G.**, Skurikhina L.A., Bondar E.I., Crane P.A., Brykov V.I.A. Phylogeography of northern Dolly Varden *Salvelinus malma malma* from northeastern Asia and northwestern North America // 7th International Charr Symposium, September 3–6, 2012, Yuzhno-Sakhalinsk, Russia: Program and Abstracts of Presentations. Yuzhno-Sakhalinsk, Russia, 2012. P. 15.

41. Yamamoto S., Maekawa K., Morita K., Crane P., **Oleinik A.** Population genetic structure and phylogeography of a salmonid fish, Dolly Varden *Salvelinus malma*: multiple glacial refugia in the North Pacific rim // 7th International Charr Symposium, September 3–6, 2012, Yuzhno-Sakhalinsk, Russia: Program and Abstracts of Presentations. Yuzhno-Sakhalinsk, Russia, 2012. P. 16.

42. Bondar E.I., **Oleinik A.G.**, Skurikhina L.A. Changes of genetic variability due to genetic drift in populations of charrs genus *Salvelinus* // 7th International Charr Symposium, September 3–6, 2012, Yuzhno-Sakhalinsk, Russia: Program and Abstracts of Presentations. Yuzhno-Sakhalinsk, Russia, 2012. P. 51.

ОЛЕЙНИК Алла Геннадьевна

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ГОЛЬЦОВ РОДА *SALVELINUS*:  
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук