

*На правах рукописи*



**Семенченко Александр Анатольевич**

**Филогения и механизмы формирования ареалов хариусов  
бассейна реки Амур (род *Thymallus*, Salmonidae)**

03.02.06 – ихтиология

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

Владивосток  
2013

Работа выполнена на Кафедре биоразнообразия и морских биоресурсов  
Школы естественных наук Дальневосточного федерального университета (ДВФУ)

Научный руководитель

доктор биологических наук,  
профессор Иванков Вячеслав Николаевич

Официальные оппоненты:

Книжин Игорь Борисович,  
доктор биологических наук, профессор,  
Иркутский государственный университет,  
профессор кафедры

Рожкован Константин Васильевич,  
кандидат биологических наук,  
ФГБУН Биолого-почвенный институт ДВО РАН,  
старший научный сотрудник

Ведущая организация

Камчатский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения  
науки Тихоокеанского института географии Дальневосточного отделения  
Российской академии наук (КФ ТИГ ДВО РАН)

Защита состоится 26 декабря 2013 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета  
Д 005.008.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения  
Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.  
Телефон: 8 (423) 2310905; факс 8 (423) 2310900; электронный адрес:  
inmarbio@mail.primorye.ru

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

Автореферат разослан «\_\_» ноября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Е.Е. Костина

**Актуальность темы.** Хариусы юга Дальнего Востока России являются ценнейшими объектами любительского рыболовства, а также модельной группой рыб для изучения биогеографии. Долгое время считалось, что в бассейне Амура обитает лишь один вид хариуса – амурский хариус (*Thymallus grubii* Dybowski, 1869). Однако многие авторы отмечали значительную неоднородность различных популяций этого вида, что впоследствии дало предпосылки для пересмотра таксономического статуса хариусов Амура [Книжин и др., 2004; 2006; 2007 и др.]. И.Б. Книжин с соавторами описывает желтопятнистую форму (*T. grubii flavomaculatus* Knizhin, Antonov et Weiss 2006) и нижеамурскую (*T. tugarinae* Knizhin, Antonov, Safronov et Weiss, 2007) [Книжин и др., 2006; 2007]. Верхнеамурская форма стала номинативным подвидом хариуса, описанного Б. Дыбовским как *T. grubii grubii* Dybowski, 1869. А.Л. Антонов [2004] описал крупночешуйную форму как *T. burejensis* Antonov 2004.

Несмотря на проведенную ревизию, мнения о систематическом положении амурских хариусов до сих пор остаются противоречивыми. Некоторые авторы ставят под сомнение валидность описанных хариусов [Зиновьев, 2005а,б]. Другие повышают подвидовой ранг верхнеамурского и желтопятнистого хариуса до видового [Bogutskaya et al., 2008]. Эти и другие примеры показывают необходимость дальнейших работ по уточнению таксономического положения амурских хариусов.

Большой интерес представляют филогенетические связи амурских хариусов и их положение относительно других представителей рода. Многие вопросы эволюции и центров происхождения хариусовых рыб остаются неясными.

Хариусовые рыбы обладают высокой реофильностью, что способствует их активному расселению в смежные водотоки вследствие перестроек речных систем. Высокий интерес представляют популяции, некогда отделившиеся от хариусов основного бассейна р. Амур и находящиеся длительное время изолировано. Время формирования подобных популяций позволяет выдвигать гипотезы об эволюции хариусов в основном бассейне реки.

**Цель настоящей работы** – выяснить историю происхождения и путей распространения хариусов бассейна р. Амур на основании молекулярно-генетических данных и ряда других сведений. Используя гаплотипические сети и филограммы отдельных видов, а также калибровку молекулярных часов, установить возможные их центры происхождения и время этих событий. Объяснить современное распределение

хариусов в Амурском бассейне, исходя из полученных молекулярно-генетических данных. Обсудить таксономическое положение некоторых амурских хариусов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить филогенетические связи и рассчитать генетические расстояния амурских хариусов между различными их локализациями, а также между ними и европейским, сибирским хариусами и некоторыми представителями Алтае-Саянского региона;
2. Построить сети гаплотипов по контрольной области мтДНК для трех форм амурских хариусов;
3. Скорректировать используемую в литературе калибровку молекулярных часов для полученных нами участков мтДНК;
4. Сравнить генетические расстояния мтДНК разных таксонов хариусов для установления таксономического статуса ряда амурских форм.

**Научная новизна.** Предложена новая гипотеза происхождения и обоснование основных этапов дивергенции амурских хариусов. Показано подчиненное положение европейского, сибирского вида, а также рыб Алтае-Саянского региона относительно амурских хариусов. Впервые для некоторых амурских хариусов обосновываются центры их происхождения, а также время активного формирования их ареалов. Объяснены возможные причины симпатричного обитания ряда форм и их распределения в речном бассейне. Показан ряд несоответствий между генетическими расстояниями и таксономическим статусом некоторых амурских хариусов.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Новые данные представляют интерес для решения задач пресноводной биогеографии Дальневосточного региона, а также объясняют нерешенные вопросы относительно механизмов и времени освоения биотой водотоков, сопредельных с р. Амур. Полученная информация о наличии и состоянии популяций хариусов в прошлом позволит оценить реальность угрозы для существующих в настоящее время популяций этих рыб.

#### **Методология и методы исследований.**

Методология молекулярной биологии и генетики. В работе использованы: метод определения первичной последовательности нуклеотидов по Сенгеру, реконструкция филогенетических связей методами байесовского моделирования, методы максимального правдоподобия и ближайшего связывания, построение сетей

гаплотипов методом минимального остоного дерева, расчет генетических расстояний.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Основные этапы дивергенции предковых форм хариусовых рыб проходили в Амурском бассейне;
2. Верхнее течение р. Амур и Приамурье в различные геохронологические периоды были заселены несколькими видами хариусов, которые находились в отношениях значительной межвидовой конкуренции;
3. Происхождение желтопятнистого хариуса связано с комплексом рек Коппи и Тумнин;
4. Наиболее вероятный центр происхождения верхнеамурского хариуса находится в бассейне р. Сунгари или р. Ялуцзян;
5. Формирование ареала нижнеамурского хариуса происходило в направлении от южного Приморья к верхнему течению р. Амур.

**Фактический материал.** Материалом для работы послужили сборы хариусов, собранные в период с 2002 по 2012 гг. автором работы, а также любезно предоставленные коллегами. Собран материал как в водотоках бассейна р. Амур, так и в реках бассейнов Японского и Охотского морей. Всего было получено 92 последовательности длиной 1043-1066 пар нуклеотидов для контрольной области мтДНК. Филогенетические связи и генетические расстояния строились также по 127 последовательностям субъединицы 16S рРНК, субъединицы 1 никотинамидадениндинуклеотида дегидрогеназы, субъединицы 1 цитохромоксидазы, цитохрома *b*, а также ряда фланкирующих тРНК длиной 554-1379 пар нуклеотидов.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на 6-й и 7-й краевых научных конференциях школьников по естественным дисциплинам «Творческая молодежь – потенциал российской науки» (Владивосток, 2003, 2004), на 6-й Региональной конференции по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии студентов, аспирантов, молодых преподавателей и сотрудников вузов и научных организаций Дальнего Востока России (Владивосток, 2003), на Всероссийской конференции «Комплексные исследования и переработка морских и пресноводных гидробионтов» (Владивосток, 2003), на двух Всероссийских конференциях «Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова» (Владивосток, 2005, 2008), на 14-м Краевом конкурсе молодых ученых и аспирантов «Молодые

ученые – Хабаровскому краю» (Хабаровск, 2012), на 3-й Московской международной конференции «Molecular Phylogenetics» (Москва, 2012).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них одна – в издании, рекомендованном ВАК Российской Федерации; 5 статей – в отечественных периодических изданиях и региональных сборниках; 5 работ опубликованы в материалах международных, российских и региональных конференций.

**Личный вклад автора.** Автором собран и обработан ихтиологический материал из бассейна р. Самарга (Приморский край) и Лангры (о. Сахалин). Весь процесс пробоподготовки и молекулярно-генетического анализа сделан лично автором. Сборка нуклеотидных последовательностей, построение филогенетических деревьев, общая программная обработка и интерпретация полученных результатов также проведены лично автором.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 151 странице, состоит из введения, 5 глав, выводов, списка сокращений и списка литературы. Содержит 19 таблиц и 24 рисунка. Список литературы состоит из 145 источников, в том числе 53 на иностранных языках. Имеется приложение, состоящее из 4 таблиц.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.б.н. профессору В.Н. Иванкову (ДВФУ, кафедра биоразнообразия и морских биоресурсов) за ценные замечания и советы, полученные в процессе работы. Особую признательность автор выражает заведующему лабораторией генетики ИБМ ДВО РАН д.б.н. профессору В.А. Брыкову, а также научному сотруднику лаборатории паразитологии БПИ ДВО РАН к.б.н. Д.М. Атопкину за всестороннюю помощь в генетических работах. Автор благодарит К.А. Винникова за помощь в освоении современных методов обработки генетической информации. Благодарность за помощь в осмыслении результатов выражается к.б.н. А.Л. Антонову (ИВЭП ДВО РАН, Хабаровск) и к.б.н. А.Ю. Семенченко (Приморский Океанариум). За помощь в сборе материала выражается благодарность к.б.н. П.Б. Михееву, к.б.н. С.Ф. Золотухину (ХфТИНРО), В.А. Паренскому (ИБМ ДВО РАН), Г.Н. Вороной и О.Н. Вороному (п. Лазо, Приморский край). Автор благодарит также общество изучения Амурского края (ОИАК) за предоставление литературы о составе ихтиофауны в исторические периоды. Отдельная благодарность выражается д.г.н. А.Н. Махинову, В.В. Коробову и к.г.н. И.И. Крылову за обсуждение вопросов причин и механизмов перестроек речных систем, гляциальных, вулканических и других геоморфотектонических процессов.

## Введение

Во введении обозначены актуальность темы, цели и задачи исследований, научная новизна и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту, сведения о публикациях и апробации работы, приведена информация о структуре диссертации, выражены благодарности.

### Глава 1 Обзор литературы по проблеме исследования

#### 1.1 Краткая история изучения хариусов Амурского бассейна

Впервые для Амурского бассейна хариус был указан академиком И.Г. Георги под названием *Salmo thymallus* [Georgi, 1775]. Спустя столетие, Б.И. Дыбовским хариус Амура описывается по 4 экз. из р. Онон и р. Ингода под названием *Thymallus grubii* Dybowski, 1869. Академик Л.С. Берг [1916] пересматривает систематическое положение амурских и байкальских хариусов, которым он придает статус подвидов сибирского хариуса *T. arcticus*. Подвидовой статус амурского хариуса закрепился в литературе на длительный срок, а некоторыми авторами рассматривается и в настоящее время [Зиновьев, 2005a]. Японский исследователь Т. Мори описал из бассейна р. Ялуцзян новый подвид сибирского хариуса *T. arcticus yaluensis* Mori, 1928, который был сведен в синонимию с одним из видов амурских хариусов лишь недавно [Ma B. et al., 2008].

К. Пивничка и К. Гензель [Pivnicka, Hensel, 1978] предприняли попытку провести ревизию рода *Thymallus*, в результате которой амурский хариус приобрел видовой статус, что подтвердили исследования П.Я. Тугариной и В.С. Храмцовой [1980]. Некоторые авторы подвергали критике использованные авторами методы [Зиновьев, 1980; Черешнев, 1983 и др.], в результате чего таксономический ранг амурских хариусов снова стал сомнительным. Видовой статус амурских хариусов подтвердился благодаря работе А.Н. Макоедова [1999] на основании кариологии, биохимической генетики и популяционной фенетики.

Рядом авторов была показана морфологическая и генетическая изменчивость хариусов внутри Амурского бассейна [Антонов 1995, 2001; Шедько, 2001; Froufe et al., 2003; Froufe et al., 2005], в результате которой выделялся ряд форм с неясным таксономическим статусом: «верхнеамурская», «желтопятнистая», «нижнеамурская» и «крупночешуйная». Некоторые из этих форм рассматривались в качестве обособленных видов [Шедько, 2001].

На основании полученных данных об изменчивости амурских хариусов была проведена крупная ревизия видового состава амурских хариусов, в результате которой описаны следующие таксоны: *T. burejensis* Antonov, 2004 – буреинский хариус («крупночешуйная форма»); *T. grubii flavomaculatus* Knizhin, Antonov et Weiss, 2006 – желтопятнистый хариус и *T. tugarinae* Knizhin, Antonov, Safronov et Weiss, 2007 – нижеамурский хариус. Исследованы также морфобиологические характеристики выделяемых и описанных таксонов [Семенченко, 2003 а-в; 2004, 2005, 2008, Михеев, 2008, 2010; Михеев и др., 2012; Семенченко, 2013; и др.].

Таксономический статус описанных видов не вызывал сомнений у большинства авторов, за исключением подвидового ранга желтопятнистого хариуса, который рассматривался в качестве самостоятельного вида [Bogutskaya et al., 2008; Eschmeyer, 2013]. Кроме четырех форм хариусов, некоторые авторы отмечают обитание ленского хариуса, таксономический статус которого также неоднозначен, в некоторых притоках р. Амур и Уда [Bogutskaya et al., 2008; Антонов, Книжин, 2011; Ma B. et al., 2011]. Этот хариус был описан как подвид сибирского, *T. arcticus baicalolenensis*, Matveyev, Samusenok, Pronin et Tel'pukhovsky, 2005. Другие авторы рассматривали эту форму в видовом статусе [Bogutskaya et al., 2008; Книжин и др., 2008], отмечая нарушения правил зоологической систематики при его описании [Книжин, 2009]. В настоящей работе ленский хариус обозначен как *T. sp. (lenensis)*.

Таким образом, в Амурском бассейне обитают пять репродуктивно изолированных форм хариусов, которые имеют широкие зоны симпатрии. Остается множество нерешенных вопросов относительно видообразования амурских хариусов, их филогенетических связей с остальными представителями рода, а также таксономический статус двух форм.

## **1.2 Филогения и гипотезы происхождения хариусовых рыб**

Вопросы относительно географического центра происхождения современных хариусов, их эволюции, расселения, а также выделения архаичных и продвинутых представителей, являются весьма дискуссионными. Долгое время наиболее древним хариусом считался монгольский по таким признакам, как высокое количество хряща в черепе, большие челюсти с хорошо развитыми челюстными зубами и др. [Световидов, 1936; Тугарина, 1981; Зиновьев, 2005а]. Полученные филогенетические связи по молекулярно-генетическим данным показали сестринское положение этого вида относительно других форм Алтае-Саянского региона [Koskinen et al., 2002;

Froufe et al., 2005]. На основании сиквенсов контрольной области мтДНК показано, что современные хариусы имеют четыре филогенетические линии, одна из которых включает амурского (*T. grubii*), вторая нижеамурского хариуса (*T. tugarinae*), третья европейского (*T. thymallus*), а четвертая – остальных хариусовых рыб, обитающих в Алтае-Саянского регионе и субарктическом поясе Голарктики (сибирские хариусы).

И.Б. Книжин [2009] высказал гипотезу о двух возможных центрах формирования хариусовых рыб: Алтае-Саянском и Амурском. При этом первый регион сформировал европейского хариуса, а второй – сибирского. Дальнейшее видообразование проходило аллопатрически в различных смежных областях с выделенными центрами.

Установление порядка ветвления четырех филогенетических линий хариусов было связано с использованием кодирующих участков мтДНК и построением укорененного дерева с представителями лососевых и сиговых рыб [Crete-Lafreniere et al., 2012; Шедько и др., 2013]. Установлено, что базальное положение на дереве занимают два вида амурских хариусов. Следующий кластер включает европейского хариуса, а затем сибирского, байкальского и монгольского хариусов. Несмотря на отсутствие ряда видов, Алтае-Саянский центр происхождения хариусов оказался под сомнением ввиду базального расположения амурских видов и зависимого от них европейского хариуса. Таким образом, дальнейшее уточнение филогении хариусовых рыб связано с использованием консервативных участков генома и включением в дерево других видов хариусов.

## Глава 2 Материал и методика

Материалом для работы послужили сборы хариусов из следующих речных бассейнов: Амазар (*Thymallus grubii grubii*), Буряя (*T. sp. (lenensis)*), Буряя (*T. burejensis*), Киран, Ульбан, Тумнин, Анюй, Коппи, Самарга (*T. grubii flavomaculatus*), Тугур, Иска, Лангры, Мы, Красная, Уссури, Киевка (*T. tugarinae*). Для ловли рыб использовались нахлыстовая и поплавочная удочки, накидная и ставная сети, а также мальковый невод. Для указанных выше форм получены нуклеотидные последовательности контрольной области, субъединицы никотинамидадениндинуклеотида дегидрогеназы 1, субъединицы 1 цитохромоксидазы, цитохрома *b*, а также ряда фланкирующих тРНК мтДНК. Было получено 92 последовательности длиной 1043-1066 пар нуклеотидов для контрольной области мтДНК, которые использовались для построения сетей гаплотипов. Филогенетические связи и генетические расстояния строились также по 127

последовательностям длиной 554-1379 пар нуклеотидов, полученным по остальным участкам мтДНК. Участки генома мтДНК для нижнеамурского (*T. tugarinae*) и желтопятнистого хариусов (*T. grubii flavomaculatus*) были получены с семи и шести локализаций соответственно.

Для молекулярно-генетического анализа использовали фрагменты сердца или туловищной мускулатуры рыб. Экстракцию ДНК проводили с помощью набора «ДНК-сорб-В» от компании «ИнтерЛабСервис» и «PureLink Genomic DNA Kits» от компании «Invitrogen» по прилагаемым протоколам. Фрагменты генома мтДНК были амплифицированы с использованием десяти праймеров, специфичных к соответствующим участкам. Часть использованных праймеров произведены самостоятельно. ПЦР-реакция проходила в стандартных условиях. Количество тотальной ДНК и продуктов ПЦР определяли методом электрофореза.

Реакцию секвенирования проводили в соответствии с протоколом к BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit на генетическом анализаторе ABI 3130xl. Сборку и выравнивание последовательностей проводили посредством программного модуля CLUSTAL-W, интегрированного в пакет MEGA 5.1 [Tamura et al., 2007]. Выбор оптимальной модели для расчета генетических расстояний осуществляли с помощью программы jModelTest v. 0.1 [Posada, 2008]. Реконструкцию филогенетических связей осуществляли с помощью программы mrbayes3.2 [Ronquist, Huelsenbeck, 2003] методом байесовского моделирования. Для установления статистической достоверности узлов ветвления деревьев использовалась апостериорная вероятность байесовского моделирования, а также бутстреп-поддержки методов максимального правдоподобия и ближайшего связывания. Сеть гаплотипов строили с помощью метода минимального остовного дерева MST [Rohlf, 1973], интегрированного в программу Arlequin v. 3.11. Генетические расстояния рассчитывались в программе MEGA v. 5.1.

### **Глава 3 Генетическая изменчивость и внутривидовая структура амурских хариусов**

#### **3.1 Генетическая изменчивость**

Суммарная длина исследованных участков мтДНК после сборки и выравнивания для разных видов хариусов составила от 4775 до 3670 пар нуклеотидов (пн.). Наибольшая генетическая изменчивость по контрольной области мтДНК оказалась у верхнеамурского хариуса, что подтверждается числом переменных сайтов, транзиций и трансверсий, средним числом попарных различий, а также нуклеотидным и

гаплотипическим разнообразием. Меньшие показатели демонстрировал желтопятнистый хариус, а изменчивость нижеамурского оказалась относительно гомогенной.

Выявлены высокие отличия между различными формами хариусов по частотам использования кодонов по двум генам мтДНК, субъединицы 1 цитохромоксидазы и цитохрома *b*. Кроме того, отличия по этому признаку показали некоторые обособленные популяции нижеамурского и желтопятнистого хариусов.

## **3.2 Внутривидовая структура амурских хариусов**

### **3.2.1 Нижеамурский хариус (*Thymallus tugarinae*)**

Генетические расстояния между нижеамурскими хариусами из разных локальностей по двум участкам мтДНК, контрольной области и субъединицы 1 цитохромоксидазы (2205 пн.) варьировали в диапазоне 0,08–1,42%. Наибольшую обособленность показывает популяция р. Киевка, которая отличается от основной группы на 1,24–1,42%. Остальные выборки различаются не более чем на 0,27%.

Филогенетические связи нижеамурских хариусов были реконструированы методом байесовского моделирования (рисунок 1). Полученные данные указывают на явную генетическую обособленность хариусов р. Киевка от рыб из других водоемов. Популяция формирует отдельную филогенетическую линию, которая дифференцировалась в относительно ранний эволюционный период вида.

Гаплотипы нижеамурского хариуса по контрольной области мтДНК демонстрируют невысокую внутривидовую изменчивость. Большинство особей этого вида имеют три основных гаплотипа, куда входят рыбы, собранные в реках Красная, Лангры, Уссури, Мы и Иска. Общий гаплотип имеют также рыбы из р. Тугур, Мы и Емурхэ. Остальные особи отличаются от четырех основных гаплотипов не более чем в два–три мутационных шага. Рыбы р. Киевка отличаются от основной гаплогруппы на 12 мутационных шагов, имея при этом высокую однородность внутри группы. Используя полученные генетические данные и литературные сведения, установлено, что проникновение этого вида в реки Тугур и Уда происходило сравнительно недавно, в конце среднего плейстоцена благодаря перестройкам рек Тугур и Нимелен, а также колебаниям уровня моря. Попадание рыб в водотоки северо-западного Сахалина также происходило благодаря колебаниям уровня океана. Способ образования популяции в р. Киевка до конца не установлен и, возможно, связан с перестройками рек Уссури и Милоградовка.

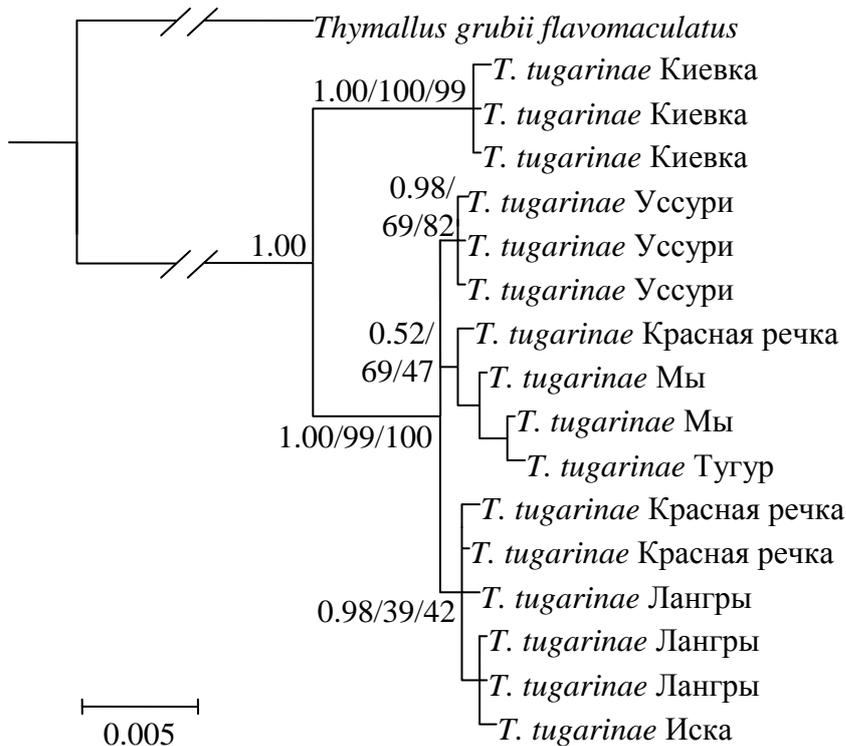


Рисунок 1. – Филограмма *T. tugarinae*, полученная по результатам анализа субъединицы 1 цитохромоксидазы и контрольной области мтДНК (2205 пн.). Апостериорная вероятность ВА анализа, а также бутстреп поддержка ML и NJ анализов указана в соответствующих узлах ветвления.

На основании полученных данных и иных сведений предполагается происхождение нижнеамурского хариуса в изолированных реках южного Приморья. Этот вид имеет сходные гаплотипы во всем бассейне р. Амур (от верхнего до нижнего течения), включая ряд изолированных водотоков, что показывает недавнее формирование его ареала. В южном Приморье этот вид имеет сплошной ареал и не образует зон симпатрии с другими видами. Его обитание в этом районе известно со среднего плейстоцена, судя по генетически обособленной популяции р. Киевка. В нижнем течении р. Амур в зонах симпатрии с желтопятнистым хариусом, этот вид нерестится на 7–10 дней раньше, чем *T. grubii flavomaculatus*. Это указывает на его более южное происхождение [Книжин и др., 2007]. Популяционно-генетические исследования китайских специалистов показали, что направление формирования ареала этого вида шло в направлении от нижнего течения р. Амур (р. Уссури) к верхнему (реки Хумархэ и Емурхэ) [Ma B. et al., 2009], что согласуется с нашими данными.

### 3.2.2 Желтопятнистый хариус (*T. grubii flavomaculatus*)

Генетические расстояния по контрольной области и субъединице 1 цитохромоксидазы между выборками желтопятнистых хариусов демонстрируют высокую обособленность образцов из р. Киран (1,06–1,54%), а также комплекса Коппи+Тумнин (1,21–1,54%) от остальных локализаций. Наибольшие отличия проявляются между указанными выше образцами (1,51–1,54%). Хариусы из бассейна р. Амур (р. Анюй) относительно сходны с рыбами р. Ульбан (0,29%). Филогенетические связи желтопятнистых хариусов демонстрируют базальное расположение рыб рек Тумнин и Коппи. Следующая ветвь включает рыб р. Киран, однако узел ее ветвления не поддержан тремя методами реконструкции филогенетических деревьев. Высокую поддержку имеет узел ветвления рыб рек Анюй и Ульбан (рисунок 2). Использование более короткого участка мтДНК с включением проб из генного банка показало, что рыбы из р. Самарга имеют сходный геном с особями р. Ботчи и занимают сестринское положение относительно базального кластера рек Коппи+Тумнин. Следующая ветвь образована рыбами р. Киран. Рыбы из р. Мерек образуют общий кластер с выборками рек Анюй и Ульбан и имеют подчиненное положение от остальных кластеров.

Желтопятнистые хариусы демонстрируют высокую внутривидовую дифференциацию по сетям гаплотипов. Полученные данные показывают существование трех основных гаплогрупп: 1. Коппи+Тумнин; 2. Анюй+Ульбан и 3. Киран. Ключевой группой внутри исследуемого вида следует считать первую группу ввиду ее наибольшей генетической гетерогенности. Гаплотипы из р. Амур более гомогенны. Сравнение сетей гаплотипов с нижеамурским хариусом показало, что *T. grubii flavomaculatus* имеет большую внутривидовую изменчивость, что подтверждается генетическими расстояниями.

Формирование ареала желтопятнистого хариуса имело сходные механизмы с *T. tugarinae*. Основной способ освоения рек, входивших в состав бассейнов ПраУды и Пра-Сырана – колебания уровня Охотского моря в плейстоцене. В то же время, геном этого подвида показал, что формирование его ареала проходило раньше, чем у нижеамурского хариуса. Освоение рек Тугур, Самарга, Максимовка происходило благодаря перестройкам речных систем. Филогенетические связи и сети гаплотипов указывают на происхождение желтопятнистых хариусов в комплексе рек Коппи+Тумнин, что подтверждается паразитологическими данными [Шедько, 2006].

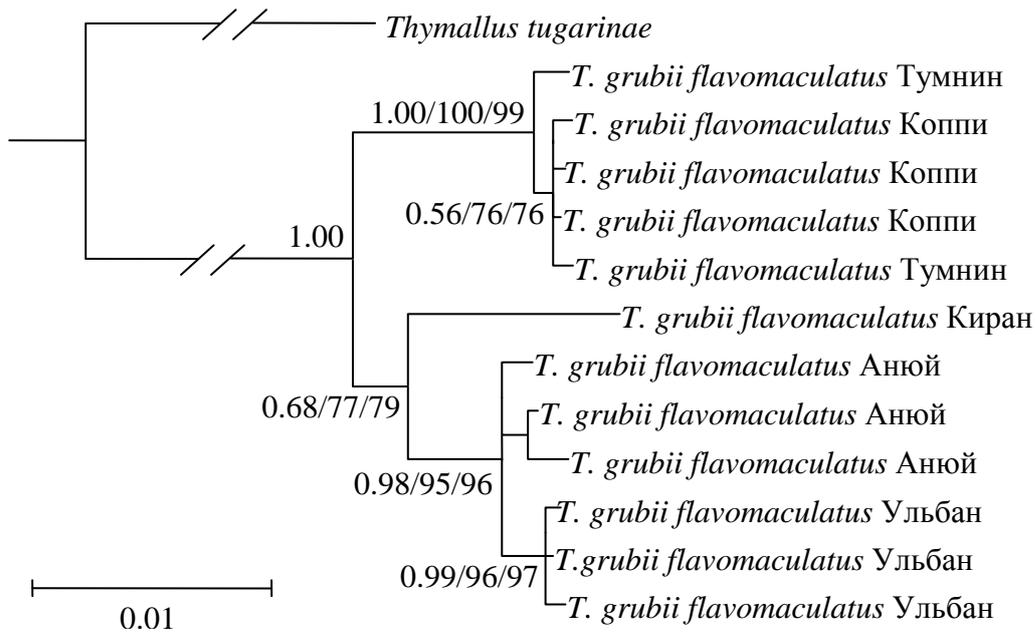


Рисунок 2. – Филограмма *T. grubii flavomaculatus*, полученная по результатам анализа субъединицы 1 цитохромоксидазы и контрольной области мтДНК (2204 пн.) с помощью байесовского моделирования.

### 3.2.3 Верхнеамурский хариус (*T. grubii grubii*)

Генетические расстояния по контрольной области мтДНК между различными локализациями верхнеамурского хариуса по контрольной области мтДНК демонстрируют высокие значения. Наиболее обособленными являются рыбы из рек Ганьхэ (приток р. Нэньцзян, басс. р. Сунгари), Ялуцзян (Желтое море) и Бурея (0,80–1,44%). Средние различия между остальными выборками составляют 0,2–1,07%. За исключением выборок р. Бурея, рыбы из основного бассейна р. Амур различаются на 0,2–0,52%. Филогенетические связи показывают существование одного общего кластера, на котором обособленное положение занимают рыбы из рек Ганьхэ и Ялуцзян. Гаплотипические сети демонстрируют наибольшую гетерогенность в сравнении с другими формами хариусов. Особи внутри бассейна р. Сунгари отличаются на 22 мутационных шага, а внутри р. Ялуцзян – на 15 мутаций. В то же время, рыбы р. Амур относительно сходны, а максимальные отличия составляют 12 мутационных шагов. Таким образом, гаплотипические сети показывают относительно давнее формирование ареала верхнеамурского хариуса. Предполагается его образование в комплексе рек Сунгари+Ялуцзян с последующим проникновением в верхнее течение р. Амур.

## Глава 4 Филогенетические связи видов и форм хариусов

### 4.1 Филогения амурских хариусов и других представителей рода

Для установления филогенетических связей амурских хариусов с другими представителями рода нами построено дерево на основании четырех участков мтДНК: 16S рРНК, субъединицы 1 NADH-дегидрогеназы, субъединицы 1 цитохромоксидазы и цитохрома *b*. Топология полученного дерева показала базальное расположение двух видов амурских хариусов (рисунок 3). Сестринскими кладами к амурским видам оказались последовательно: европейский хариус (*T. thymallus*), буреинский (*T. burejensis*), ленский (*T. sp. (lenensis)*) и сибирский виды (*T. arcticus*).

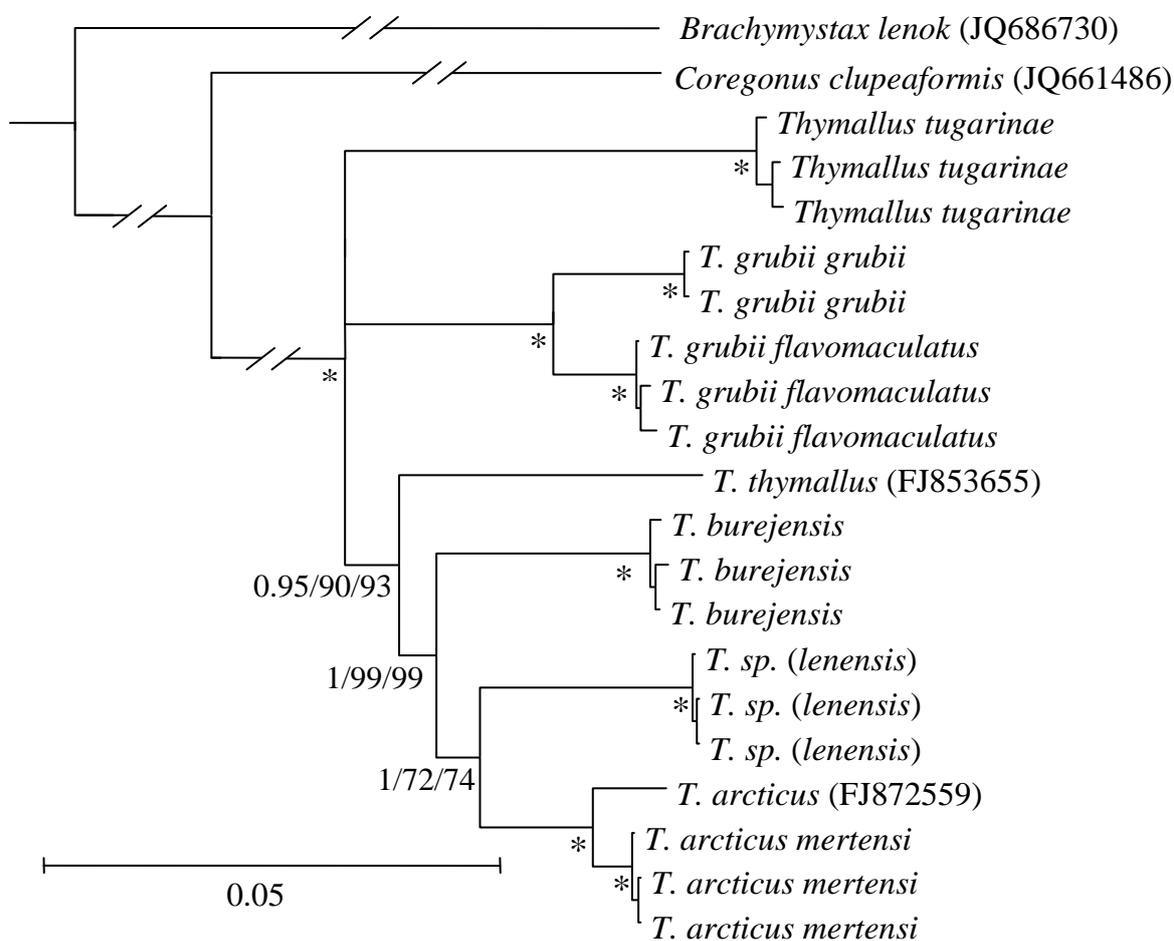


Рисунок 3. – Укорененная филограмма представителей рода *Thymallus*, полученная по результатам анализа 4 участков мтДНК с помощью байесовского моделирования. Апостериорная вероятность ВА анализа, а также бутстреп-поддержка ML и NJ анализов указана в соответствующих узлах ветвления. Символ \* означает 100% бутстреп-поддержку и апостериорную вероятность тремя методами построения деревьев.

Полученные данные свидетельствуют о существовании предковых форм хариусов в Амурском бассейне с их последующим расселением по Голарктике. Таким образом, из двух центров происхождения хариусовых рыб, предложенных И.Б. Книжиным [2009], только Амурский центр следует рассматривать в качестве такового, тогда как группа видов Алтае-Саянского региона является зависимой от амурских рыб. Использование трех участков мтДНК по другим видам (байкальский, монгольский, ленский и сибирский хариусы), взятых из генного банка показало, что они имеют сестринское положение относительно буреинского хариуса.

#### 4.2 Происхождение и основные этапы формирования ареалов амурских хариусов

На основании полученных филогенетических связей основных представителей хариусовых рыб, а также внутривидовой изменчивости амурских хариусов, нами высказана гипотеза основных этапов происхождения и формирования ареалов амурских хариусов. С использованием литературных данных о рисунке речной сети р. Амур в начале плиоцена и полученных молекулярно-генетических данных, нами построена предполагаемая схема распределения предковых форм хариусовых рыб (рисунок 4).

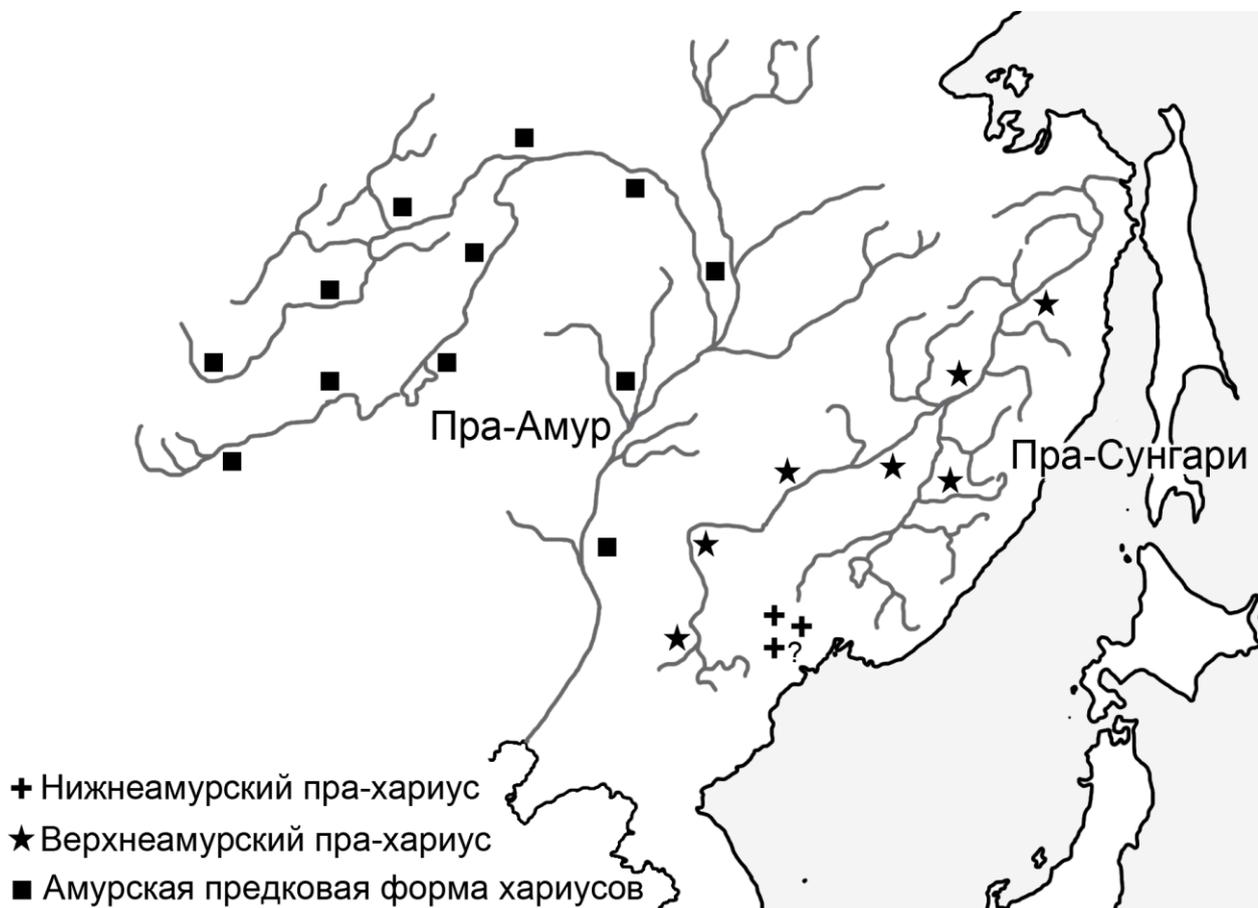


Рисунок 4. – Предполагаемая схема предковых форм хариусовых рыб в начале плиоцена

Предполагается, что предковая форма европейского хариуса вышла из бассейна р. Амур в начале плиоцена. Позже произошло видообразование буреинского и ленского хариусов, однако возможные центры этих событий остаются предметом дискуссий. В то же время установлено, что ленский хариус обитает во многих притоках рек Амур и Уда, на основании чего нами предполагается существование сплошного ареала этого вида в прошлом (рисунок 5). Судя по сходству верхнеамурского и желтопятнистого хариусов, предполагается образование последнего в раннем плейстоцене благодаря обособлению в комплексе рек Коппи и Тумнин.



Рисунок 5. – Предполагаемая схема аллопатрического формирования ареала желтопятнистого хариуса

Дальнейшие события связаны с формированием ареалов верхнеамурского, а позже желтопятнистого хариусов (рисунок 6). Первый вид, видимо, повсеместно вытеснил ленского хариуса в притоки высокого порядка верхнего течения р. Амур. Причины конкуренции между разными видами амурских хариусов не установлены и требуют дальнейших исследований. В середине плейстоцена желтопятнистый хариус

обитал во всем нижнем течении р. Амур, а также в ряде изолированных рек Охотского моря (Ульбан, Тугур, Уда и сопредельные водотоки).



Рисунок 6. – Предполагаемая схема формирования ареалов желтопятнистого и верхнеамурского хариусов в раннем–среднем плейстоцене

Последний этап формирования современного распределения хариусов в Амурском бассейне связан с расселением нижнеамурского хариуса по нижнему, среднему и верхнему течению р. Амур, где он, вероятно, вытеснял остальные формы хариусов (рисунок 7). Вследствие этого желтопятнистый хариус имеет разорванный ареал. Обособленные популяции занимают верхнее течение всех крупных притоков нижнего Амура (Амгунь, Гур, Анюй, Хор, Бикин и др.). Сходное распределение отмечается в реках Тугур и Уда. В результате процессов видообразования и формирования ареалов сформировалась картина современного распределения хариусовых рыб в бассейне р. Амур и на сопредельных территориях (рисунок 7).



Рисунок 7. – Предполагаемая схема формирования ареала нижнеамурского хариуса в позднем плейстоцене

Сравнение двух других видов, верхнеобского (*T. nikolskyi*) и верхнеенисейского (*T. svetovidovi*) хариусов показало различие в 0,83% по контрольной области мтДНК. На основании полученных генетических расстояний нами делается предложение повысить подвидовой статус двух указанных выше подвидов до видового.

Ленский хариус имеет дистанции между байкальским хариусом в 2,67%, а с сибирским – 4,04% по контрольной области мтДНК. Этот хариус, безусловно, имеет статус вида, что подтверждается литературными данными [Книжин и др., 2008; Книжин, 2009].

## Глава 5 Калибровка и применение молекулярных часов для хариусов р. Амур

В результате многочисленных процессов репликации в геноме организмов возникают случайные ошибки, мутации. При неизменной скорости накопления мутаций в геноме становится возможным рассчитывать время дивергенции между

двумя последовательностями и предполагать сходное время дивергенции видов. Анализ генетических дистанций между *T. tugarinae* и другими формами хариусов по синонимичным заменам субъединицы 1 цитохромоксидазы и цитохрома *b* показал соблюдение молекулярных часов на хариусовых рыбах. Предложенная М. Коскиненом с соавторами [Koskinen et al., 2002] скорость накопления мутаций в 1% за 1 млн. лет по контрольной области мтДНК была скорректирована для использованных в работе участков и составила 1,24% за млн. лет.

Калибровка молекулярных часов выполнена на примере популяции нижеамурских хариусов р. Киевка. Предполагается, что хариусы проникли в этот бассейн благодаря известной речной перестройке между реками Милоградовка и Уссури в среднем плейстоцене (781–126 тыс. лет назад). Сопоставляя время речной перестройки и генетических расстояний, установлено, что мутации накапливаются со скоростью 1,65–10,29%. Полученная калибровка требует подтверждения посредством биогеографических исследований южного Приморья.

### Выводы

1. На основании филогенетических связей, полученных по результатам анализа сиквенсов четырех участков мтДНК, показано сестринское положение европейского, сибирского хариусов и рыб Алтае-Саянского региона от предковых форм амурских хариусов. Полученные данные свидетельствуют о том, что основные этапы дивергенции предковых форм хариусовых рыб проходили в бассейне р. Амур.

2. Филограммы хариусовых рыб и генетические расстояния показали наибольшую обособленность нижеамурских хариусов от остальных представителей рода *Thymallus*. Гомогенность последовательностей контрольной области мтДНК указывает на его относительно недавнее обитание во всех обследованных локализациях по сравнению с другими видами. Предполагается возникновение этого вида в южном Приморье.

3. Желтопятнистый хариус имеет в своем ареале несколько генетически обособленных популяций. Особенности его распределения в бассейне р. Амур и сети гаплотипов предполагают наличие в прошлом сплошного ареала этого подвида в нижнем течении р. Амур и в сопредельных водотоках. Филогенетические связи свидетельствуют о происхождении желтопятнистых хариусов в комплексе рек Тумнин+Коппи.

4. Молекулярно-генетические данные показывают высокую внутривидовую изменчивость верхнеамурского хариуса как в бассейне р. Сунгари, так и в верховьях р. Амур. Эти рыбы образовали множество обособленных популяций в своем ареале. На основании сетей гаплотипов нами предполагается происхождение верхнеамурских хариусов в бассейне р. Сунгари с последующим проникновением в верховья р. Амур.

5. На основании результатов анализа пар сравнений генетических расстояний различных видов и подвидов хариусовых рыб, считаем, что необходимо повысить подвидовой статус верхнеамурского, желтопятнистого и ленского хариусов до видового.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

#### **Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ**

1. Семенченко, А. А. Сравнительный анализ дальневосточных видов хариусов по данным секвенирования гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК / А. А. Семенченко, Д. М. Атопкин // Известия ТИНРО. – 2012. – № 168. – С. 59–69.

#### **Статьи, опубликованные в отечественных периодических изданиях и региональных сборниках**

2. Семенченко, А. А. Биология амурского хариуса *Thymallus arcticus grubei* р. Самарга / А. А. Семенченко // Комплексные исследования и переработка морских и пресноводных гидробионтов. – Владивосток: ТИНРО-центр, 2003. – С. 75–77.

3. Семенченко, А. А. Особенности биологии амурского хариуса *Thymallus arcticus grubii* Dybowski реки Самарга // Чтения памяти В. Я. Леванидова. – Владивосток: Дальнаука, 2005. – Вып. 3. – С. 519–526.

4. Семенченко, А. А. Сравнительный морфологический анализ желтопятнистого хариуса *Thymallus grubii flavomaculatus* Knizhin, Antonov et Weiss / А. А. Семенченко // Чтения памяти В. Я. Леванидова. – Владивосток: Дальнаука, 2008. – Вып. 4. – С. 371–377.

5. Семенченко, А. А. К вопросу о возрасте нижеамурского хариуса (*Thymallus tugarinae*, Thymallidae) реки Лангры острова Сахалин / А. А. Семенченко // Жизнь пресных вод. – Владивосток: Дальнаука, 2013. – Вып. 1. – С. 241–251.

6. Семенченко, А. Ю. Состояние рыбных сообществ в бассейне р. Самарга в 2005–2006 гг. (Северное Приморье) / А. Ю. Семенченко, А. А. Семенченко // Жизнь пресных вод. – Владивосток: Дальнаука, 2013. – Вып. 1. – С. 226–240.

**Работы, опубликованные в материалах международных, российских и региональных конференций, симпозиумов**

7. Семенченко, А. А. Хариусы реки Самарга / А. А. Семенченко // Тез. 6-ой краевой научн. конф. школьников по естественным дисциплинам «Творческая молодежь – потенциал российской науки». – Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2003. – С. 14–15.

8. Семенченко, А. А. Некоторые аспекты морфологии хариусов *Thymallus arcticus grubei* реки Самарга / А. А. Семенченко // Тез. VI регион. конф. по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии студентов, аспирантов, молодых преподавателей и сотрудников вузов и научных организаций Дальнего Востока России. – Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2003. – С. 87–88.

9. Семенченко, А. А. Новые данные о биологии сибирского хариуса из бассейна р. Самарга / А. А. Семенченко // Тез. 7-ой краевой научн. конф. школьников по естественным дисциплинам «Творческая молодежь – потенциал российской науки». – Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2004. – С. 15–16.

10. Михеев, П. Б. Сравнительный анализ сейсмодатированной системы и осевого скелета двух видов хариусов *Thymallus* (Thymallidae) реки Аней (бассейн нижнего Амура) / П. Б. Михеев, О. А. Мазникова, А. А. Семенченко // Молодые ученые – Хабаровскому краю: матер. XIV Краевого конкурса молодых ученых и аспирантов. – Хабаровск: Изд-во Тихоокеан. гос. ун-та, 2012. – Т. 2. – С. 251–259.

11. Semenchenko, A. A. Calibration of molecular clock for graylings of Amur basin using three mitochondrial gene sequences / A. A. Semenchenko // Contributions to the 3<sup>rd</sup> Moscow International Conference «molecular Phylogenetics». – Moscow, 2012. – P. 98.