

Семина
Алиса Владимировна

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ В ДВУХ
ГРУППАХ РЫБ СЕМЕЙСТВ MUGILIDAE И CYPRINIDAE**

03.00.15 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2008

Работа выполнена в лаборатории генетики Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской Академии наук

Научный руководитель

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Брыков Владимир Алексеевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Балакирев Евгений Станиславович

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Шедько Сергей Владимирович

Ведущая организация

**Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН**

Защита состоится « 27 » марта 2008 г. в « 10 » часов на заседании диссертационного совета Д.005.008.01 при Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Адрес: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Факс: (4232) 310-900

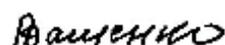
E-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

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

Автореферат разослан « ___ » февраля 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Ващенко М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Филогения и систематика многих таксонов костистых рыб в значительной степени исследованы на основе морфологических признаков. Однако эти данные не дают полного представления об эволюционных процессах, имеющих место внутри каждой группы таксонов (Nelson, 1994). Молекулярная генетика предоставляет огромные возможности для исследования разнообразия в разных систематических группах благодаря высокому разрешению ДНК-анализа и способности оценить время происхождения дивергировавшего таксона с помощью «молекулярных часов». Она играет важную роль в распознавании криптических видов, когда традиционные подходы беспомощны (Knowlton, 2000). Настоящая работа направлена на изучение эволюционных и филогенетических отношений в двух семействах рыб: Mugilidae и Cyprinidae с помощью молекулярно-филогенетических методов. Виды первого семейства распространены повсеместно, а виды второго являются эндемиками дальневосточных морей. В то же время для представителей обоих семейств характерны значительное морфологическое сходство и эвригалинность. Кроме того, обе группы характеризуются недостаточной изученностью и неопределенностью в систематике и филогении. Все это определило их выбор в качестве моделей для настоящего исследования.

Цели и задачи исследования. Цель данной работы – изучение молекулярной эволюции и филогенетических отношений девяти видов кефалевых (сем. Mugilidae) и шести видов карповых (сем. Cyprinidae) рыб с помощью молекулярно-филогенетических методов.

В соответствии с заявленной целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать уровень внутривидовой генетической изменчивости у представителей семейств Mugilidae и Cyprinidae.
2. С использованием молекулярных маркеров уточнить филогенетические отношения у видов семейства Mugilidae, включая ранее неисследованных дальневосточных представителей, и выяснить возможные причины и факторы их дивергентной эволюции.
3. С использованием молекулярно-филогенетических методов уточнить филогенетические отношения представителей дальневосточных видов семейства Cyprinidae и выяснить возможные причины и факторы их дивергентной эволюции.
4. Провести сравнительный анализ филогений, полученных с использованием различных молекулярных маркеров в двух группах исследованных видов.
5. С использованием анализа нуклеотидных последовательностей мтДНК и ядерных генов выяснить механизм дивергентной эволюции двух форм *Tribolodon hakonensis*.

Научная новизна. Уточнена филогения кефалевых рыб. Впервые было показано, что *Liza haematocheilus* (syn. *Chelon haematocheilus*) и *Chelon labrosus* парафилетичны. Рекомендована синонимизация родов *Liza* и *Chelon*.

Впервые изучена внутривидовая изменчивость мтДНК в популяциях *T. hakonensis*, *T. brandtii* и *T. sachalinensis* в российской части ареала.

Уточнена филогения дальневосточного рода *Tribolodon*. Впервые показано, что *T. hakonensis* представлен на ареале двумя значительно отличающимися по мтДНК формами. Получены прямые генетические доказательства того, что южная

форма представляет собой самостоятельный вид, образовавшийся более 4 млн. лет назад в результате гибридизации северной формы *T. hakonensis* и *T. brandtii*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Работа послужит основой для дальнейших исследований в области систематики и филогении семейств Mugilidae и Cyprinidae. За время работы были определены и депонированы в международную базу данных GenBank 45 новых нуклеотидных последовательностей генов митохондриальной и ядерной ДНК.

Разработанные генетические маркеры могут быть применены для идентификации исследованных видов в таксономических, эволюционных и рыбохозяйственных целях, а также в проекте по штрих-кодированию Fish-BOL. Полученные данные о наличии двух форм (видов) красноперок могут быть использованы в рыбохозяйственной практике для идентификации, оценки запасов и прогноза численности.

Полученные в ходе данной работы результаты используются в спецкурсе «Молекулярная филогенетика» в Дальневосточном Государственном университете (ДВГУ).

Апробация работы. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: «Фундаментальные исследования морской биоты» (Владивосток, 2002), «Marine environment, nature, communications and business» (Владивосток, 2003), «PICES XIV Annual Meetings, Mechanisms of climate and human impacts on ecosystems in marginal seas and shelf regions» (Владивосток, 2005), «4th International Symposium «Promoting Environmental Research in Pan-Japan Sea Area» (Канадзава, Япония, 2006), «XII European Congress of Ichthyology» (Цавтат, Хорватия, 2007), «Современные проблемы биологической эволюции» (Москва, 2007), на Российско-Корейском семинаре молодых ученых по науке и технологии (Новосибирск, 2007), на ежегодных конференциях Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, 2005-2007 гг.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 178 страницах, иллюстрирована 33 рисунками и содержит 22 таблицы. Список литературы содержит 164 наименования.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Президиума ДВО РАН (гранты 06-I-П10-015, 06-I-П11-025, 06-III-B-06-212, 06-III-D-06-235), РФФИ (07-04-08419-з), гранта Фонда содействия отечественной науке «Лучший аспирант РАН-2007, 2008» и при финансовой поддержке НОЦ ДВГУ за счет средств фонда US CRDF.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему руководителю Вл.А. Брыкову за внимательное и конструктивное руководство, а также Н.Е. Поляковой за неоценимую помощь в работе, при обсуждении диссертации и искренние наставления. Автор выражает благодарность группе ученых, любезно предоставивших материал для настоящей работы, таким образом, сделав ее возможной: сотрудникам ИБМ ДВО РАН: Вл.А. Брыкову, С.М. Долганову, А.Ю. Звягинцеву, Ю.Ф. Картавцеву, М.Ю. Ковалеву, В.Т. Омельченко, В.И. Радашевскому, Е.Г. Рейзману, Н.С. Романову, А.С. Соколовскому и Е.А. Чубарь, а также Ю.И. Гавренкову (ТИНРО-центр); П.К. Гудкову и В.Д. Никитину (СахНИРО, г. Южно-Сахалинск); М.В. Назаркину (ЗИН, г. Санкт-Петербург); М.А. Махоткину

(АзНИИРХ, г. Ростов-на-Дону); A.R. Rossi (University of Rome «La Sapienza», Italy); H. Sakai (National Fisheries University, Japan); P. Feng (Academia Sinica, Taiwan). Отдельное спасибо В.Н. Полякову, выловившему в р. Раздольная первую крупнорыбную красноперку с северным типом мтДНК. Автор благодарен А.Д. Кухлевскому за разработку праймеров для амплификации участка гена гормона роста карповых и Т.Ф. Прииме за помощь в выделении ДНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследования. Кефалевые: *Mugil cephalus* (12 экз.) и *Liza haematocheilus* (syn. *Chelon haematocheilus*) (20 экз.) Японского моря; *M. cephalus* (10 экз.), *L. aurata* (19 экз.) и *L. haematocheilus* (16 экз.) Азовского моря; *M. cephalus* (18 экз.), *L. aurata* (15 экз.), *L. ramado* (3 экз.), *L. saliens* (1 экз.), *Chelon labrosus* (19 экз.) бассейна Средиземного моря, а также *M. cephalus* (1 экз.), *L. haematocheilus* (1 экз.), *L. macrolepis* (2 экз.), *L. subviridis* (1 экз.) и *Valamugil cunnesius* (1 экз.) прибрежных вод о. Тайвань.

Карповые: южная (114 экз.) и северная (186 экз.) формы *Tribolodon hakonensis* (Семина и др., 2006), *T. brandtii* (258 экз.), *T. sachalinensis* (140 экз.), *T. nakamurai* (1 экз.), *Leuciscus waleckii* (7 экз.) и *Pseudaspius leptoccephalus* (1 экз.) из рек Приморья, Сахалина, Хабаровского края и о. Хонсю, Япония.

Выделение и амплификация ДНК. Тотальную ДНК выделяли из кусочков тканей, фиксированных в 95%-ном этиловом спирте по стандартной методике (Sambrook *et al.*, 1989). Амплификацию участков мтДНК и ядерных генов проводили с помощью ПЦР согласно протоколу и с использованием праймеров, разработанных и представленных в Gharrett *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2005 и Chow, Hazama, 1998.

ПЦР-ПДФ-анализ. Были амплифицированы 3 фрагмента мтДНК кефалевых, кодирующие субъединицы надоксиддегидрогеназы ND3/ND4L/ND4 и ND5/ND6 и рибосомальную РНК 12S/16S (12S/16S рРНК). ПЦР-фрагменты обрабатывали рестрикционными эндонуклеазами: *Aval*, *BsuRI*, *Cfr13I*, *Ddel*, *Hin6I*, *Hinfl*, *Mbol*, *MspI*, *MvaI*, *RsaI*, *StyI*, *TaqI* и *VspI* (Fermentas, Lithuania; Сибэнзим, Россия). У карповых были амплифицированы 4 участка мтДНК, кодирующие ND3/ND4L/ND4, ND5/ND6, 12S/16S рРНК, а также 2 субъединицы АТФазы и цитохром оксидазу III (АТФ6/АТФ8/СОIII), каждый из которых анализировали рестриктазами *Hin6I*, *MspI*, *VspI*, *PstI*, *AvaI*, *Cfr13I*, *Mbol*, *HindIII*, *RsaI*, *BsuRI*, *MvaI*, *Hinfl* и *StyI*. Продукты рестрикции разделяли в 2%-ном агарозном геле (одна часть агарозы Sigma и две части Synergel™ Diversified Biotech, Inc.) в 0.5-кратном трис-боратном буфере (Sambrook *et al.*, 1989). Фрагменты ДНК в геле окрашивали этидиумбромидом и фотографировали в проходящем UV-свете. ПЦР-фрагменты гена гормона роста (GH-1) и интрона 1 гена рибосомного белка S7 (RP-1) обрабатывали *Ddel* и *RsaI*, которые, как было показано в ходе скрининга, выявляют полиморфизм в сайтах рестрикции у карповых.

Статистический анализ. Комбинированные гаплотипы каждой особи по всем фрагментам кодировали буквами, 39 – для кефалевых, 50 – для карповых. Данные по рестрикционным фрагментам преобразовывали в бинарные матрицы. Гаплотипическое (h) и нуклеотидное (π) разнообразие, а также степень нуклеотидной дивергенции (ρ) рассчитывали по Nei (Nei, 1987) и Nei и Таджиге (Nei, Tajima, 1981) с применением пакета программ REAP (McElroy *et al.*, 1992), а также модели НКУ+G (Hasegawa *et al.*, 1985) и TrN+I+G (Tamura, Nei, 1993) в

программах PAUP* (Swofford, 2002) и Modeltest (Posada, Crandall, 1998). NJ-кластеризацию выборок дальневосточных красноперок проводили в программе NTSYS (Rohlf, 1990). Гетерогенность между выборками оценивали с помощью псевдовероятностного теста χ^2 при 95%-ном доверительном интервале (Zaykin, Pudovkin, 1993) и пакета программ Arlequin 2.000 (Schneider *et al.*, 2000). Реконструкцию сетей гаплотипов проводили по принципу минимального числа нуклеотидных замен между гаплотипами (Prim, 1957; Rohlf, 1973). Величину различий и вероятные альтернативные связи между ними, а также анализ молекулярной вариации (Excoffier *et al.*, 1992) рассчитывали в пакете программ Arlequin 2.000.

Определение нуклеотидных последовательностей. Клонирование ПЦР-продуктов осуществляли с помощью InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit (Fermentas) согласно инструкции изготовителя. Трансформацию *E. coli* плазмидной ДНК проводили с использованием хлористого марганца. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* осуществляли методом щелочного лизиса (Мазин и др., 1990). Секвенирование проводили, используя набор реактивов «Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit» V. 3.1 (Applied Biosystems, USA) по методике производителя. Последовательность ДНК определяли на автоматическом секвенаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) на базе ИБМ ДВО РАН.

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью пакета программ LASERGENE. Поиск гомологичных последовательностей осуществляли с помощью сервера BLAST2 (<http://www.ebi.ac.uk/blastall/>). Множественное выравнивание проводили с помощью программы ClustalW 1.8 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) (Thompson *et al.*, 1994).

Построение филогенетических деревьев. Филогенетические деревья строили методом максимальной парсимонии (Maximum Parsimony, далее MP) и объединения соседей (Neighbor-Joining, далее NJ) в программе PAUP* 4.0b10, а также методом Байесовского максимального правдоподобия (Bayesian Inference, далее BI) в программе MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Для MP анализа использовали эвристический поиск оптимальной топологии по методу деления-восстановления ветвей с 50 случайными добавочными последовательностями. При BI анализе создавали 2 млн. генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 100 генераций с 10 параллельными цепями и температурой цепей 0.2. Первые 1000-3000 проб (до выхода значений вероятности (Likelihood) –lnL на плато) исключали из анализа как «burn in». Устойчивость полученных филогенетических деревьев оценивали методом бутстрепа (Bootstrap Percentage, далее BP; Felsenstein, 1985), используя 1000 бутстреп-реplik, а также методом апостериорных вероятностей (Posterior Probabilities, далее PP) в BI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

КЕФАЛЕВЫЕ

Филогенетические отношения кефалевых. Наибольший уровень дивергенции наблюдается между лобаном *M. cephalus* и другими исследованными видами. Данные о генетической удаленности лобана согласуются с результатами исследований, полученных на основе изучения последовательностей ядерной и мтДНК (Caldara *et al.*, 1996; Papasotiropoulos *et al.*, 2002; Gornung *et al.*, 2007 и др.),

аллозимов (Papasotiropoulos *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2004 и др.), гемоглобинов (Rizotti, 1993) и кариологического анализа (Gornung *et al.*, 2001).

Уровень нуклеотидной дивергенции между пиленгасом *Liza (Chelon) haematocheilus* и губачом *C. labrosus* (14%), предположительно являющихся представителями одного рода *Chelon*, приблизительно в два раза больше, чем между губачом и средиземноморскими видами *Liza* (6.5-8.5%) и между пиленгасом и *L. subviridis* (8%).

Если принять, что скорость накопления нуклеотидных замен в белок-кодирующих последовательностях мтДНК пойкилотермных животных равна примерно 0.7% в миллион лет (Martin, Pulumbi, 1993; Cantatore *et al.*, 1994), то время дивергенции *M. cephalus* от остальных изученных в работе видов кефалевых составляет 31-36 млн. лет, что соответствует границе эоцена и олигоцена и совпадает с закрытием около 40-33 млн. лет назад Западного Тетиса (Хаин и др., 1997). Этим же периодом (эоцен, олигоцен – середина третичного периода) датируются и первые ископаемые остатки кефалевых рыб (Berg, 1958, цит. по: FishBase, www.fishbase.org; Никольский, 1971). Дивергенция ветви *L. haematocheilus* – *L. subviridis*, ветви средиземноморских видов *Liza* и *Chelon*, а также ветви *L. macrolepis*, имела место приблизительно 18-22 млн. лет назад в раннем миоцене. Известно, что в начале раннего миоцена имело место глобальное потепление. В среднем миоцене быстрый рост ледового щита в южной полярной области совпал с закрытием (около 15-14 млн. лет назад) Восточного Тетиса (Басов, 1999). Именно в этот период происходит дивергенция средиземноморских видов кефалей – 11-16 млн. лет назад, а также *L. haematocheilus* и *L. subviridis* – приблизительно 11 млн. лет назад.

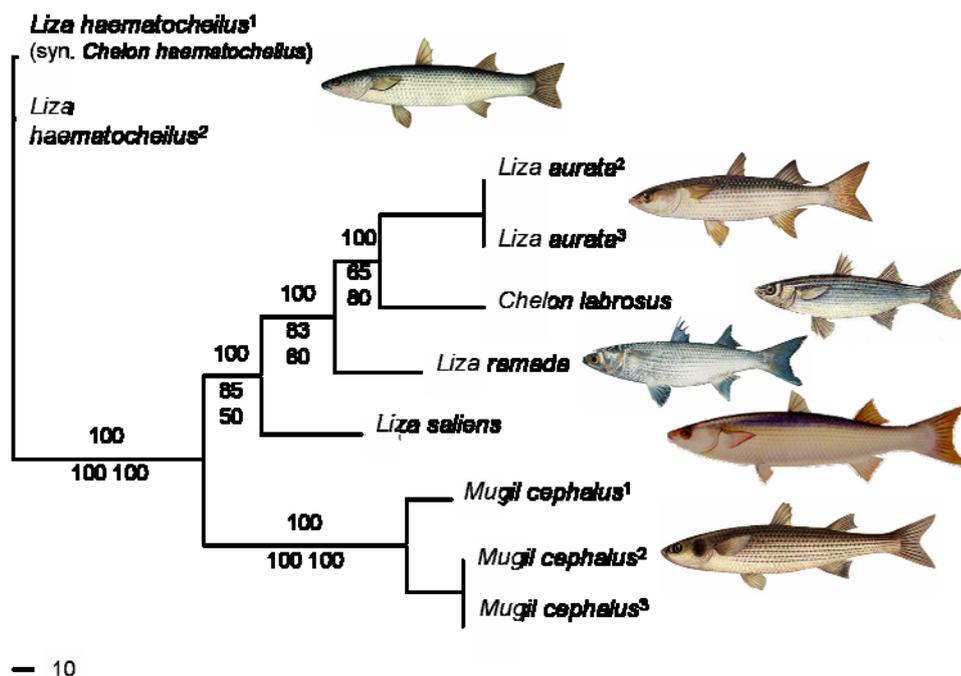


Рис. 1. МР-дерево (50%-ный консенсус 538 деревьев; L = 495, CI = 0.78, RI = 0.59), иллюстрирующее филогенетические отношения кефалевых на основе ПЦР-ПДРФ-анализа. Сверху и снизу ветвей значения ВР-поддержки для МР-, и NJ-дерева, а также РР-поддержки для ВI-дерева, воспроизводящих одинаковую топологию, соответственно. 1 – Японское море, 2 – Азовское море, 3 – Средиземное море

На филогенетических деревьях (рис. 1) губач и средиземноморские виды *Liza* кластеризуются вместе. Дерево, основанное на полиморфизме рестрикционных фрагментов, показывает, что ближайшими родственниками *C. labrosus* являются *L. aurata*, затем *L. ramado* и *L. saliens*, что согласуется с результатами, полученными другими исследователями (Rossi *et al.*, 2004; Parasotiroopoulos *et al.*, 2007).

Топология филогении, основанная на последовательностях COI (рис. 2), не дает хорошего разрешения в группе средиземноморских кефалевых, о чем свидетельствуют политомиа ветвей *L. saliens* и *C. labrosus* и слабая поддержка их устойчивости. Причиной этого, по-видимому, является недостаток признаков для выяснения их точных филогенетических отношений. Так, количество информативных для анализа максимальной парсимонии признаков, полученных при помощи ПЦР-ПДФ-анализа, составляет 80%, а секвенирования последовательностей COI – только 30%. Таким образом, анализ последовательностей гена COI имеет ограничения при построении филогении групп близкородственных видов.

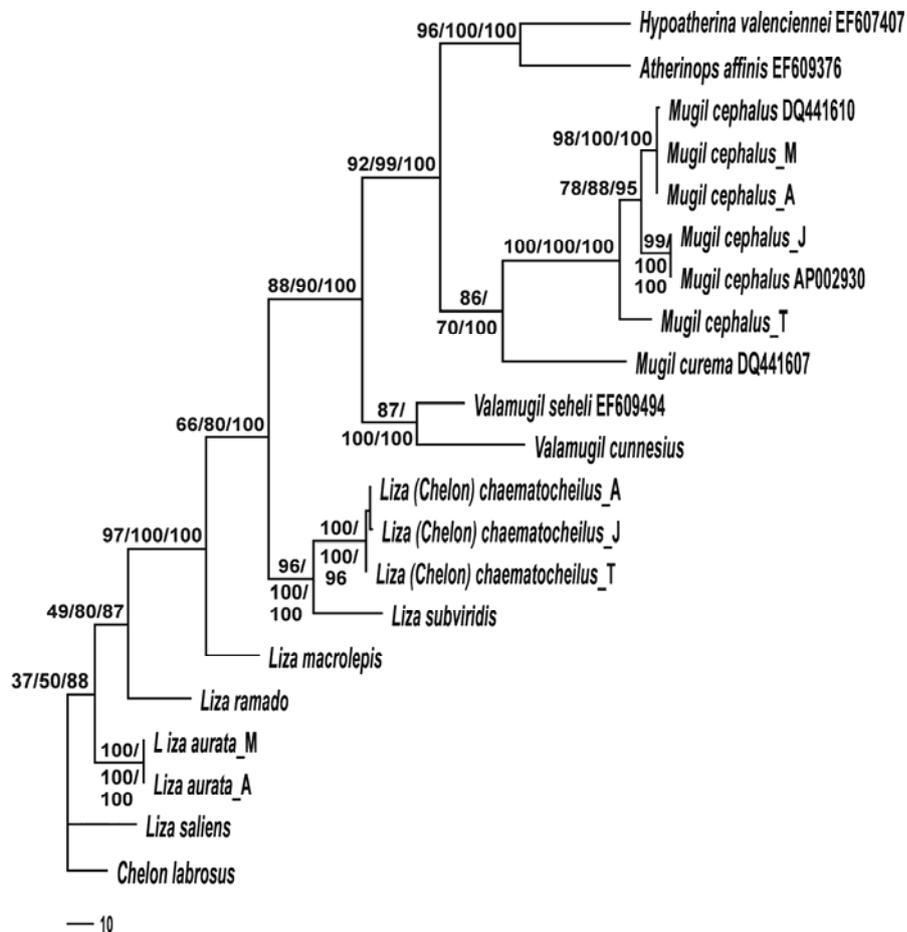


Рис. 2. Филогенетические MP-, NJ- и BI-деревья, воспроизводящие одинаковую топологию, основанные на последовательностях COI и иллюстрирующие филогенетические отношения в семействе Mugilidae. В узлах – значения BP-поддержки для MP- и NJ-деревьев и PP-поддержки устойчивости ветвей для BI-дерева соответственно. А – Азовское, М – Средиземное, J – Японское моря, Т – Тайвань. Последовательности, заимствованные в базе данных GenBank, указаны с регистрационными номерами. *Mugil cephalus* DQ441610 – Аргентина, AP002930 – Япония.

Филогенетические деревья, основанные как на рестрикционных данных, так и на секвенировании COI, показывают парафилетичность пиленгаса и губача (рис. 1, 2). Полученные нами данные служат доказательством тесной генетической связи между представителями родов *Chelon* и *Liza* (Семина и др., 2007а, б). Многие другие исследователи также констатируют близкое родство этих родов. Сравнительный анализ фарингобронхиального органа (Harrison, Howes, 1991), цитогенетических исследований (Cataduella *et al.*, 1974; Gornung *et al.*, 2001), данных по мтДНК (Caldara *et al.*, 1996; Murgia *et al.*, 2002; Papasotiropoulos *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2004; Papasotiropoulos *et al.*, 2007), ядерному геному (Gornung *et al.*, 2007; Imsiridou *et al.*, 2007) и аллозимам (Turan *et al.*, 2005) не выявил существенных различий между *C. labrosus* и тремя средиземноморскими видами *Liza*.

Следовательно, с учетом имеющихся литературных данных, полученные в настоящей работе результаты указывают на необходимость таксономической ревизии в этой группе рыб и синонимизации родов *Chelon* и *Liza*. Согласно приоритету все эти виды следует отнести к роду *Chelon* (Schultz, 1946).

Изменчивость мтДНК в выборках *M. cephalus*. Уровень генетической дифференциации между аллопатричными популяциями лобана из Японского, Азовского-Средиземного морей и о. Тайвань оказался высоким – около 4.5% нуклеотидных замен. Эта величина существенно выше, чем показанная для некоторых широко распространенных морских рыб (Mork *et al.*, 1985; Grant *et al.*, 1987; Graves, Dizon, 1989 и др.). По данным ПЦР-ПДРФ-анализа 26 из 39 использованных рестрикционных эндонуклеаз дифференцируют выборки япономорского и азово-средиземноморского лобана, а последовательности консервативного COI отличаются 17 нуклеотидными и 2 аминокислотными заменами. Интересным оказался тот факт, что тайваньский лобан отличается от азово-средиземноморского меньшим количеством нуклеотидных замен (26), чем от япономорского (31), но таким же количеством аминокислотных (3) замещений. Тогда как, например, представители разных (согласно принятой на сегодняшний день классификации) родов *C. labrosus* и *L. aurata* отличаются 40 нуклеотидными и 3-мя аминокислотными заменами.

Отсутствие общих гаплотипов между выборками *M. cephalus* из Японского vs. Азовского и Средиземного морей (рис. 3) свидетельствует об их длительной генетической изоляции. Время дивергенции япономорского и азово-средиземноморского лобана приходится на конец миоцена (около 6.4 млн. лет назад). Считается, что в этот период резко ускорившееся накопление льда в Антарктиде синхронно с понижением уровня океана на 40 м, приведшего к глобальной регрессии, стали причиной так называемого «мессинского кризиса», т.е. полной изоляции Средиземного моря (Басов, 1999).

Известно, что морфометрические дистанции между аллопатричными популяциями *M. cephalus* высоки и достаточны для идентификации этих популяций, причем некоторые из них соответствуют видовым или подвиновым у других рыб (Corti, Crosetti, 1996). Таким образом, очевидна целесообразность установления подвинового статуса для некоторых популяций лобана, имеющих существенные генетические (бассейн Средиземного моря, Японское море, о. Тайвань) и морфологические (Corti, Crosetti, 1996) различия. Значительная генетическая

дифференциация между популяциями вместе с низким или нулевым уровнем потока генов дают основание предположить, что они находятся на одной из стадий видообразования.

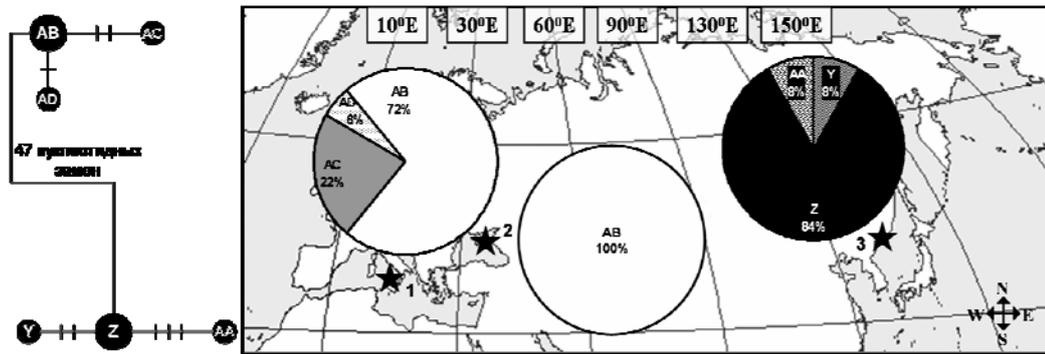


Рис. 3. Слева – гаплотипическая сеть минимальной протяженности, показывающая материнские генеалогии мтДНК у лобана. Гаплотипы показаны кружками с буквенными кодами. Наиболее распространенные гаплотипы обозначены кружками большего диаметра. Число штрихов на соединяющих ветвях соответствует количеству нуклеотидных замен между гаплотипами

Справа – географическое распределение и частоты главных мтДНК линий (в процентах) в выборках лобана. 1 – Средиземное море, 2 – Азовское море, 3 – Японское море

Изменчивость мтДНК в выборках *L. haematocheilus*. Сравнение двух популяций пиленгаса, одна из которых нативная япономорская, а вторая интродуцированная азовская, показало, что, хотя гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие в обеих выборках примерно одинаково (0.8421 и 0.7583; 0.002431 и 0.002398 соответственно), а уровень генетической дивергенции невелик (0.01%), генетические различия между приморской и азовской группами выборки достоверны по F_{ST} и частотам гаплотипов. Некоторое снижение гаплотипического разнообразия у вселенного пиленгаса за счет отсутствия части гаплотипов, свойственных приморской популяции, можно связать с перевозкой лишь части исходного генофонда и резким снижением эффективной численности (эффектом основателя, прохождением через «бутылочное горлышко») (Nei *et al.*, 1975). Уровень генетического разнообразия, соизмеримый с исходным, обеспечивается наличием с высокой частотой гаплотипа H, не встречающегося у приморского пиленгаса, и объясняется, скорее всего, селективным преимуществом ряда генотипов в новых условиях обитания в процессе адаптации (рис. 4). Похожие данные были получены при исследовании интродукции горбуши в Белое море (Гордеева и др., 2006).

Выявляемый сейчас уровень генетической дифференциации сложился всего за 4-5 самовоспроизводящихся поколений, то есть за очень короткий период времени. Это наблюдение фиксирует генетические изменения, которые сопровождают быструю адаптацию к новым весьма благоприятным условиям акклиматизации, о чем свидетельствуют показатели роста и развития, а также широкое расселение вплоть до Средиземного моря (Каца *et al.*, 1998). Эти результаты согласуются с данными Омельченко и соавторов (2004) по аллозимам, показавшими не только изменение генотипических и аллельных частот ряда локусов, но и генетическую дивергенцию образовавшихся экологических групп

вселенного пиленгаса. Благодаря подобным исследованиям можно судить о генетических процессах, которые происходят при переселении популяций в новую среду обитания, и, очевидно, имели место в ходе исторического расселения видов.

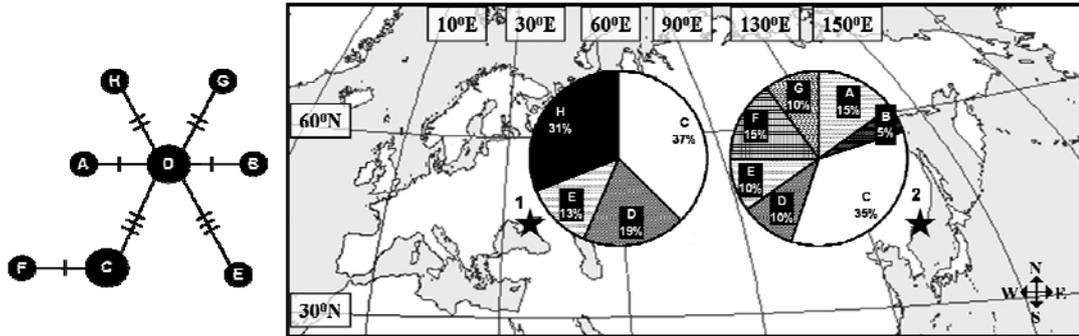


Рис. 4. Слева – гаплотипическая сеть минимальной протяженности, показывающая материнские генеалогии мтДНК у пиленгаса. Гаплотипы показаны кружками с буквенными кодами. Наиболее распространенные гаплотипы обозначены кружками большего диаметра. Число штрихов на соединяющих ветвях соответствует количеству нуклеотидных замен между гаплотипами.

Справа – географическое распределение и частоты главных мтДНК линий (в процентах) в выборках пиленгаса. 1 – Азовское море, 2 – Японское море

Изменчивость мтДНК в выборках *L. aurata*. Различия между азовскими и средиземноморскими выборками сингиля значимы по F_{ST} и частотам гаплотипов. Однако большинство гаплотипов в гаплотипической сети являются близкородственными (рис. 5). Среди них имеются как повсеместно встречающиеся, так и индивидуальные, характерные для определенной популяции, что свидетельствует об отсутствии выраженной филогеографической структуры.

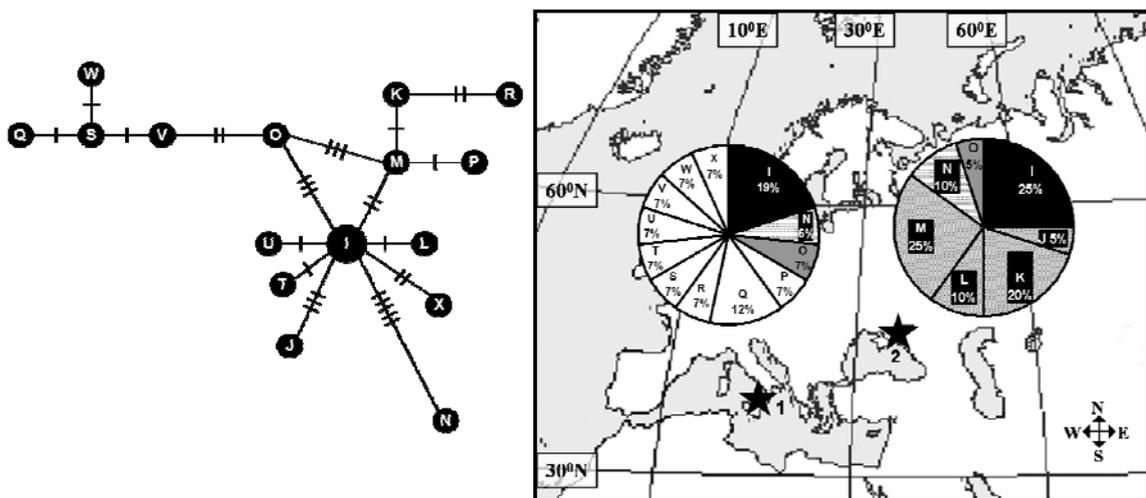


Рис. 5. Слева – гаплотипическая сеть минимальной протяженности, показывающая материнские генеалогии мтДНК у сингиля. Гаплотипы показаны кружками с буквенными кодами. Наиболее распространенный гаплотип обозначен кружком большего диаметра. Число штрихов на соединяющих ветвях соответствует количеству нуклеотидных замен между гаплотипами.

Справа – географическое распределение и частоты главных мтДНК линий (в процентах) в выборках сингиля. 1 – Средиземное море, 2 – Азовское море

Общие гаплотипы в таких случаях представляют собой плезиоморфные признаки, тогда как редкие предположительно являются их апоморфными производными. Отсюда можно сделать вывод о том, что в настоящее время поток генов между этими популяциями отсутствует или незначителен, хотя исторический контакт обеих популяций – относительно недавнее событие (Avice, 2000).

КАРПОВЫЕ

Филогенетические отношения карповых. Среди изученных видов карповых рыб наиболее генетически удаленным видом является язь *L. waleckii*. Его дивергенция от остальных видов лежит в пределах между 14.8% и 17.2%. Жерех *P. leptocephalus* является ближайшим родственником дальневосточных красноперок рода *Tribolodon*. Близкое родство жереха и дальневосточных красноперок (7.8-11.1%) согласуется с данными по аллозимам (Картавцев и др., 2002; Sakai *et al.*, 2002), 16S рРНК (Sakai *et al.*, 2006), а также *cyt b* и D-петле (Sasaki *et al.*, 2007). Различия между мтДНК внутри рода *Tribolodon* оцениваются примерно такими же величинами: между *T. hakonensis* и двумя другими видами – *T. brandtii* и *T. sachalinensis* – 10.9%, между *T. brandtii* и *T. sachalinensis* – 8.5%. Филогенетические деревья показывает близость этих двух родов (рис. 6). Таким образом, полученные в настоящей работе данные поддерживают предложение о необходимости таксономической ревизии в этой группе карповых и синонимизации родов *Tribolodon* и *Pseudaspius* (Sasaki *et al.*, 2007).

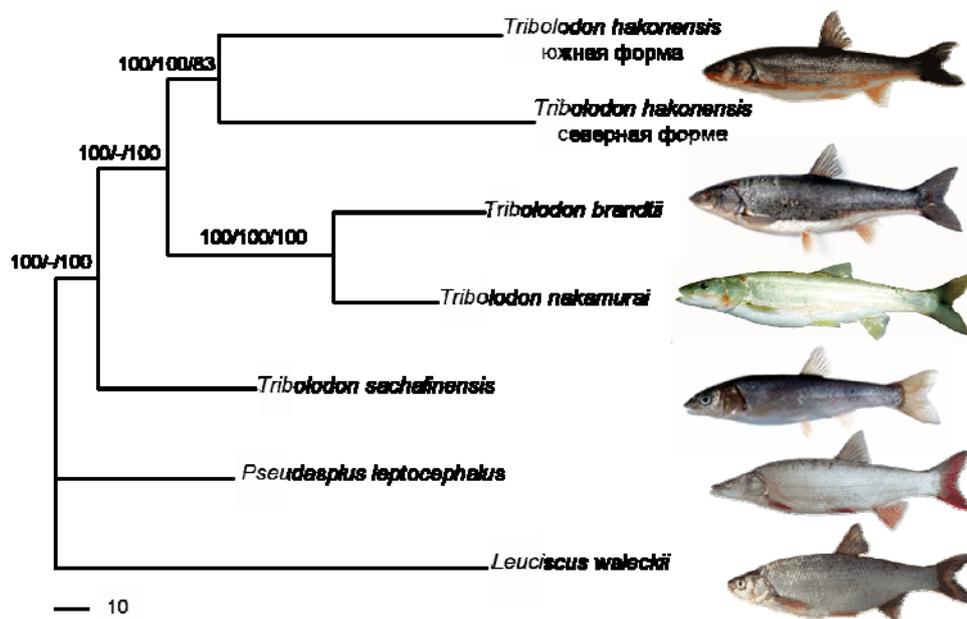


Рис. 6. МР-дерево (50%-ный консенсус 534 деревьев; L = 495, CI = 0.78, RI = 0.59), иллюстрирующее филогенетические отношения карповых на основе ПЦР-ПДРФ-анализа. В узлах показаны значения ВР-поддержки для МР- и NJ-деревьев и РР-поддержки для ВР-дерева, воспроизводящих по существу такую же топологию

При сравнении *T. hakonensis* из Приморья (южная форма) и Сахалина (северная форма) были выявлены неожиданно глубокие генетические различия – около 2.5% нуклеотидных замен в мтДНК (Семина и др., 2006; 2007b). У северной

югом Корейского полуострова и Японского архипелага встречаются оба аллеля в примерно одинаковой пропорции, что свидетельствует о симпатричном обитании обеих форм (Sakai *et al.*, 2002). Таким образом, факт отсутствия генетического обмена в условиях вероятной симпатрии дает основание предположить, что эти две формы представляют собой разные виды.

На филогенетических деревьях (рис. 6) южная форма крупночешуйной красноперки кластеризуется с северной, а мелкочешуйная красноперка – с накамураи. Сахалинская красноперка находится в основании кластера *Tribolodon*, что согласуется с результатами, полученными Картавцевым и др., 2002. Топология филогении, основанная на последовательностях COI (рис. 7), не дает хорошего разрешения и показывает политомию ветвей *T. hakonensis* и *T. sachalinensis*. Причиной этого, так же, как у кефалевых является недостаток признаков для выяснения их точных филогенетических отношений. Так, количество информативных для анализа максимальной парсимонии признаков, полученных с использованием ПЦР-ПДРФ-анализа, составляет 74%, а секвенирования последовательностей COI – лишь 20%. Следовательно, пример с карповыми также демонстрирует ограничение использования последовательностей гена COI для построения филогении близкородственных видов.

На основе калибровки скорости накопления мутаций в гене *cyt b* для карповых рыб (Zardoya, Doadrio, 1999; Dowling *et al.*, 2002) было рассчитано время дивергенции исследуемых видов. Оказалось, что дивергенция родов *Tribolodon* и *Pseudaspius* от общего предка (26-29 млн. лет назад) приходится на поздний олигоцен. Именно в это время, как показывают данные геологии, на месте Японского моря существовало пресное или солоноватое палео-Японское озеро (Kaseno, 1989, Fujita, 1990, Taira, 1990, цит. по: Sakai *et al.*, 2002; Kobayashi, Takano, 2001). Примерно этим же периодом датируются ископаемые находки *Tribolodon* sp. (Черешнев, 1998).

Дивергенция *T. hakonensis*, *T. sachalinensis*, *T. brandtii* и *P. leptocephalus* имела место в середине миоцена – около 11.5-14 млн. лет назад. Диверсифицирующим фактором, по всей видимости, послужила мощная трансгрессия уровня океана в раннем-среднем миоцене, результатом которой стало поступление морской воды в гипотетическое палео-Японское озеро (Kobayashi, Takano, 2001). Очевидно, приобретение толерантности к соленой воде тоже имело место в этот период времени. Дивергенция *T. nakamurai* происходит несколько позже, в конце миоцена (около 7.4 млн. лет назад). Период времени с позднего миоцена до начала плиоцена также характеризовался регрессией и трансгрессией океана (Kobayashi, Takano, 2001). Наконец, в конце плиоцена (около 4.3 млн. лет назад) произошла дивергенция северной и южной форм *T. hakonensis*. Известно, что с конца плиоцена имели место значительные регрессии и трансгрессии, обусловленные, в основном, наступлением и отступлением ледников (Kobayashi, Takano, 2001).

Таким образом, наши данные в основных положениях согласуются с результатами, полученными на основе аллозимного анализа (Sakai *et al.*, 2002).

Популяционно-генетическая структура *T. sachalinensis*. Анализ изменчивости мтДНК у *T. sachalinensis* выявил значимые отличия между всеми выборками, за исключением выборок оз. Большое Чибисанское и впадающей в него

пр. Проточная. Все остальные сахалинские выборки, несмотря на близость их географического положения (район зал. Анива), генетически неоднородны. В распределении гаплотипов в гаплотипической сетке (рис. 8) сахалинской красноперки из каждой филогруппы не выявлено какой-либо пространственной приуроченности. Как и в случае *Liza aurata* (сем. Mugilidae), гаплотипы каждой группы являются близкородственными. Среди них имеются общие (плезиоморфные), характерные для большинства выборок гаплотипы, а также редкие (апоморфные), характерные для определенной популяции. Подобная модель популяционной структуры подразумевает отсутствие выраженной филогеографической структуры и ограничение генетического обмена между популяциями в настоящее время. Однако эти популяции должны были находиться в относительно недавнем историческом контакте (Avice, 2000). Можно предположить, что этот контакт имел место в периоды плейстоценовых оледенений, когда сахалинские реки, согласно биогеографическим данным, являлись частью большой речной системы палео-Амур (Линдберг, 1972).

Таким образом, *T. sachalinensis* демонстрирует уровень популяционно-генетической структурированности, характерный для большинства пресноводных видов рыб, генетический обмен между популяциями которых затруднен или невозможен (Gyllensten, 1985; Ward *et al.*, 1994). Это согласуется с представлением о том, что сахалинская красноперка является пресноводным видом.

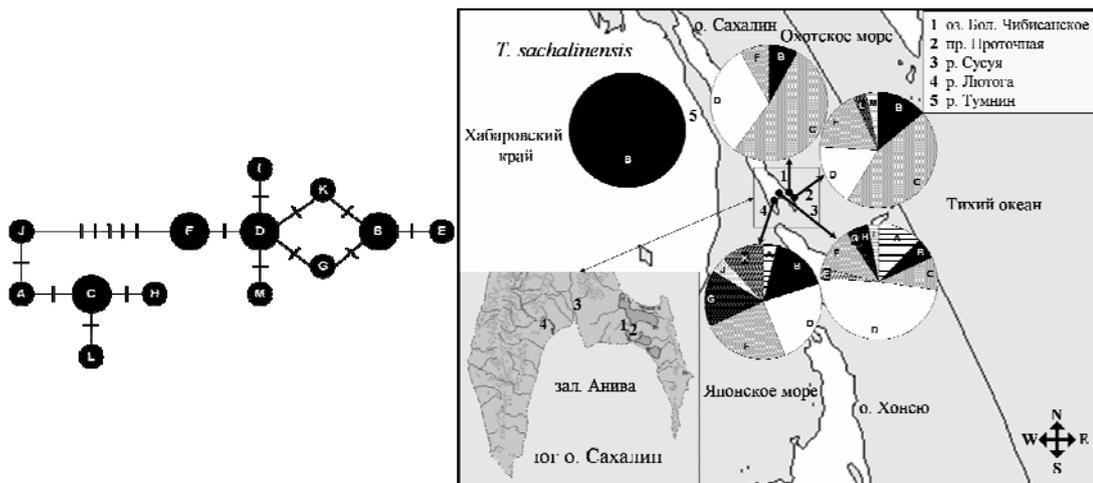


Рис. 8. Слева – гаплотипическая сеть минимальной протяженности, показывающая материнские генеалогии мтДНК у *T. sachalinensis*. Гаплотипы показаны кружками с буквенными кодами. Наиболее распространенные гаплотипы обозначены кружками большего диаметра. Число штрихов на соединяющих ветвях соответствует количеству нуклеотидных замен между гаплотипами.

Справа – географическое распределение и частоты главных мтДНК линий (в процентах) в выборках *T. sachalinensis*

Популяционно-генетическая структура *T. brandtii*. Анализ популяционно-генетической структуры *T. brandtii* показал, что выборки из южного Приморья не отличаются, в то же время существенные различия были выявлены между приморскими и сахалинской выборками. Гаплотипическая сеть (рис. 9) показывает наличие трех близкородственных филогрупп, одна из которых характерна только для сахалинской популяции, а две другие, за исключением гаплотипа С, – для

приморских. NJ-дерево также демонстрирует наличие двух обособленных кластеров – сахалинского и приморского (рис. 10). Более высокие оценки гаплотипического и нуклеотидного (0.6406 и 0.01001 vs. 0.4617 и 0.005638) разнообразия приморской формы свидетельствует о том, что центром видообразования и расселения в случае мелкочешуйной красноперки могла быть южная часть Японского моря. Это подтверждается убыванием численности *T. brandtii* с юга ареала на север (Гавренков, 1987).

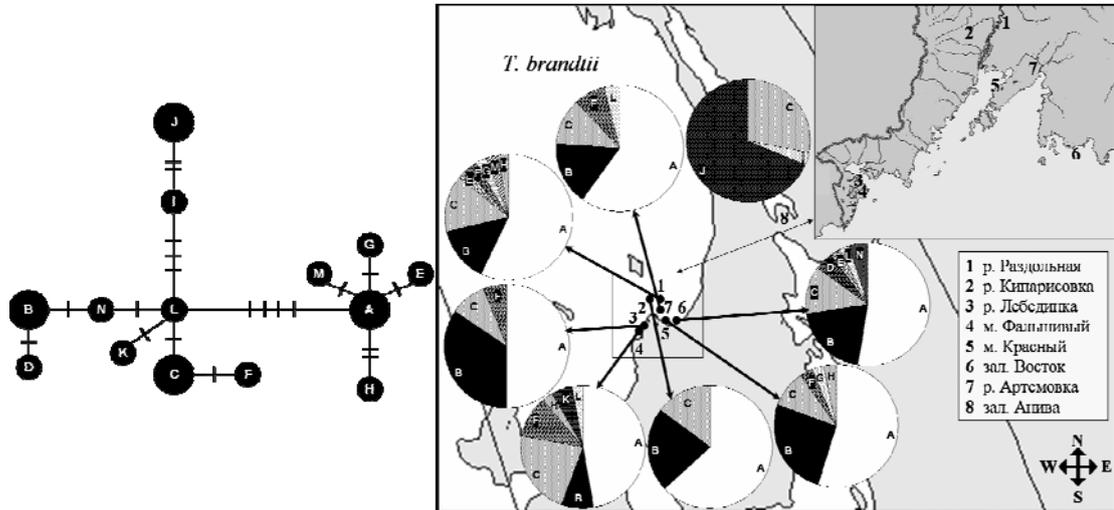


Рис. 9. Слева – гаплотипическая сеть минимальной протяженности, показывающая материнские генеалогии мтДНК у *T. brandtii*. Гаплотипы показаны кружками с буквенными кодами. Наиболее распространенные гаплотипы обозначены кружками большего диаметра. Число штрихов на соединяющих ветвях соответствует количеству нуклеотидных замен между гаплотипами.

Справа – географическое распределение и частоты главных мтДНК линий (в процентах) в выборках *T. sachalinensis*

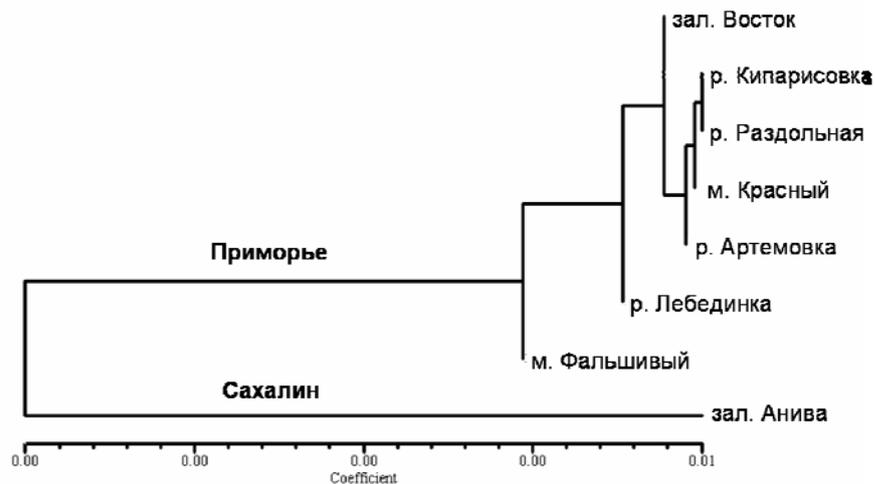


Рис. 10. NJ-дерево, иллюстрирующее филогенетические отношения между выборками *T. brandtii* на основе ПЦР-ПДРФ-анализа изменчивости мтДНК (A6/A8/COIII, ND3/ND4L/ND4 и ND5/ND6)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне миграции особей между приморскими выборками мелкочешуйной красноперки и

отсутствии у них хоминга. Однако, несмотря на анадромный образ жизни, в распространении этого вида имеются ограничения. Географически удаленные популяции демонстрируют высокий уровень популяционной дивергенции.

Популяционно-генетическая структура *T. hakonensis*. Анализ популяционно-генетической структуры *T. hakonensis* показал, что различия между южной и северной формами *T. hakonensis* высокозначимы ($P=0$). Было показано, что представители *T. hakonensis* с северным гаплотипом мтДНК встречаются в небольших количествах в водах Приморья. Из 43 обнаруженных гаплотипов 35 принадлежат северной форме и лишь 8 – южной.

Гаплотипы северной формы в свою очередь распадаются на две группы (рис. 11), несмотря на то, что представители обеих групп встречаются во всех выборках в примерно одинаковой пропорции. Между двумя филогруппами северной формы наблюдается мутационная дистанция в 16 нуклеотидных замен, а между южной и северной формами – в 20. Все три филогруппы имеют звездообразную выраженность, характерную для случаев, когда популяции в относительно недавнем историческом прошлом после уменьшения эффективного размера претерпевали экспоненциальный рост численности (Avice, 2000).

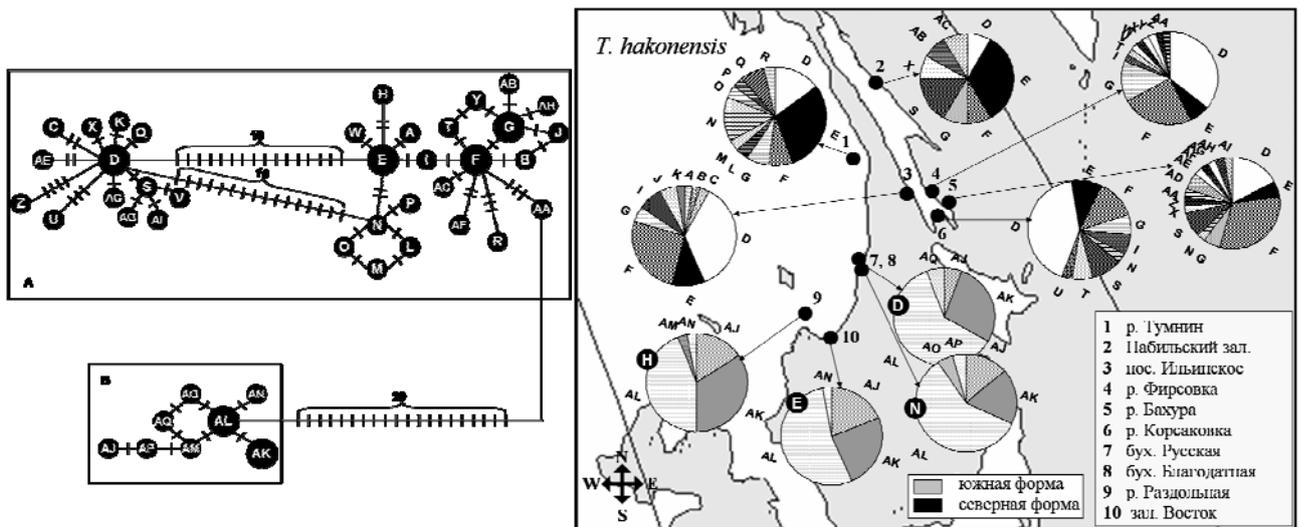


Рис. 11. Слева – гаплотипическая сеть минимальной протяженности, показывающая материнские генеалогии мтДНК у А – северной формы, В – южной формы *T. hakonensis*. Гаплотипы показаны кружками с буквенными кодами. Наиболее распространенные гаплотипы обозначены кружками большего диаметра. Число штрихов на соединяющих ветвях соответствует количеству нуклеотидных замен между гаплотипами

Справа – географическое распределение и частоты главных мтДНК линий (в процентах) в выборках *T. hakonensis*

Распределение числа нуклеотидных замен между всеми парами гаплотипов (mismatch distribution) северной формы показывает большие различия в последовательностях нуклеотидов мтДНК между особями двух групп в составе одной популяции (рис. 12). Часто подобное распределение характерно для конспецифичных представителей двух пространственно изолированных популяций (Avice, 2000). В данном случае представители обеих групп обитают совместно.

Следовательно, подобная структурированность свидетельствует о существовании барьеров, препятствовавших потоку генов в прошлом. В связи с этим логично предположить, что источниками этих двух филогрупп могли служить бассейны Охотского и Японского морей, изолированные во время наступления ледников, с сопутствующим понижением уровня океана в позднем плиоцене.

Похожие результаты были получены на основе исследования мтДНК прибрежных видов рыб п-ова Калифорния. Так, популяции северной и южной частей Калифорнийского залива имели большие генетические различия, ставшие результатом разделения в плиоцене-плейстоцене п-ова Калифорния на две части проливом, обеспечившим изоляцию рыб, обитавших в прибрежных водах (Riginos, 2005). Существенная генетическая дифференциация была показана между группами популяций кеты Японского и Охотского морей. Их дивергенция, скорее всего, была связана с плейстоценовыми оледенениями, вызвавшими изоляцию двух предположительных источников формирования этих групп – палео-Амура и палео-Суйфуна (Полякова и др., 2006). Полученные результаты согласуются также с данными о высокой дифференциации японских популяций *T. hakonensis* из озера Бива, образовавшегося в плиоцене, и Японского Внутреннего моря, изолированного от Тихого океана в периоды регрессий (Hanzawa *et al.*, 1988).

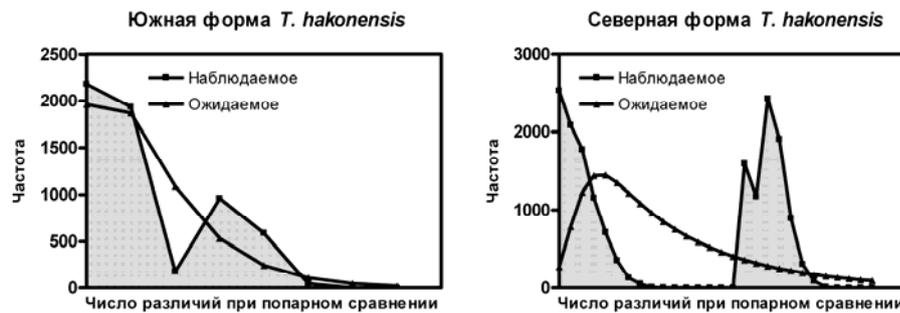


Рис. 12. Распределение числа нуклеотидных замен (mismatch distribution) между гаплотипами южной и северной форм *T. hakonensis*

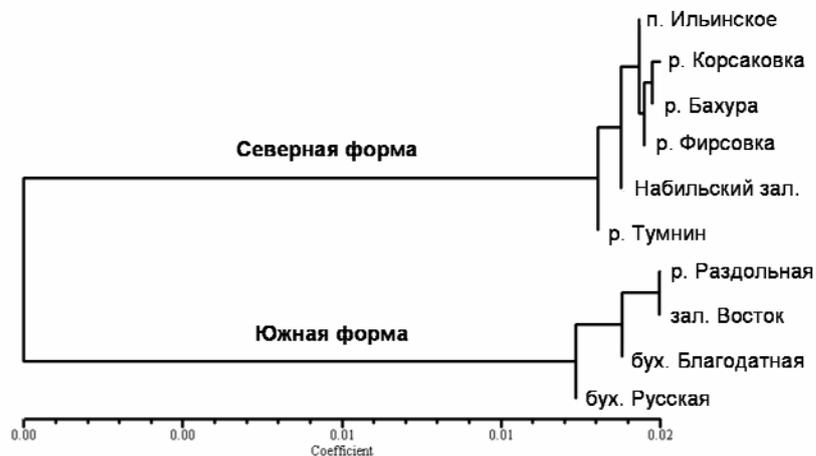


Рис. 13. NJ-дерево, иллюстрирующее филогенетические отношения между выборками *T. hakonensis* на основе ПЦР-ПДРФ-анализа изменчивости мтДНК (A6/A8/COIII, ND3/ND4L/ND4 и ND5/ND6)

NJ-дерево, представленное на рисунке 13, демонстрирует существенный уровень дивергенции мтДНК между выборками северной и южной форм *T. hakonensis* наряду с незначительными различиями между выборками внутри каждой формы.

Молекулярные доказательства видообразования южной формы *T. hakonensis*. Для объяснения возможного механизма формирования двух форм крупночешуйной красноперки было сделано предположение о том, что южная форма образовалась в результате гибридизации северной формы и мелкочешуйной красноперки. Ранее возможность гибридизации *T. hakonensis* и *T. brandtii* была показана с использованием аллозимных маркеров (Sakai, Hamada, 1985; Омельченко и др., 1986). Для подтверждения этой гипотезы были изучены последовательности ядерной ДНК: GH-1 и RP-1 этих видов. ПЦР-ПДФ-скрининг подтвердил выдвинутую гипотезу (рис. 14).

Детальный анализ нуклеотидных последовательностей у южной формы выявил мозаичность генов GH-1 и RP-1, полученных от *T. brandtii* и северной формы *T. hakonensis*. Анализ последовательностей GH-1 подтвердил, что у северной формы *T. hakonensis* имеется только аллельный вариант А. У *T. brandtii* преимущественно встречается вариант В. У южной формы *T. hakonensis* выявлены оба аллеля А и В, а также их гетерозиготные комбинации АВ (рис. 14). Анализ последовательностей нуклеотидов RP-1 показал, что у северной формы *T. hakonensis* встречаются аллельные варианты А' (преобладающий), В – редкий и их комбинации А'В. У *T. brandtii* обнаружен только вариант А. У южной формы *T. hakonensis* встречаются генотипы А и В (преобладающий), их комбинации АВ, а также производный от В генотип С и его комбинации ВС и АС (рис. 14).

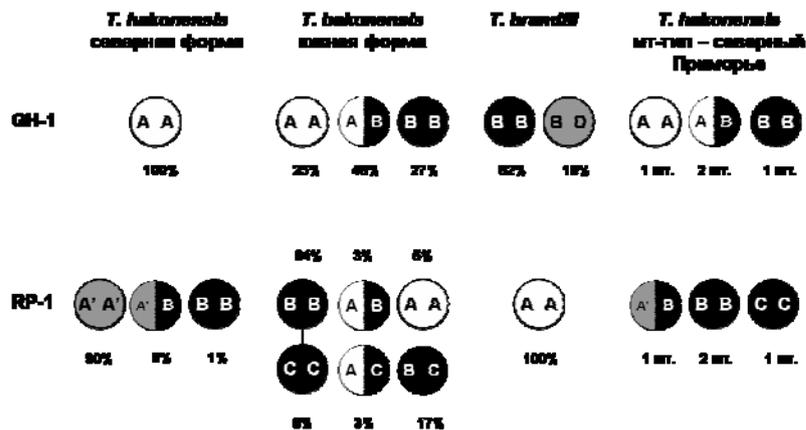


Рис. 14. Доказательство видообразования южной формы крупночешуйной красноперки путем гибридизации между северной формой *T. hakonensis* и *T. brandtii*. Генотипы и их частоты, обнаруженные при исследовании последовательностей GH-1 и RP-1 в выборках *T. brandtii*, южной и северной форм *T. hakonensis*, а также у четырех особей *T. hakonensis* с северным типом мтДНК, выловленных в водах Приморского края

Так как митохондриальный геном южной формы наиболее близок к *T. hakonensis*, можно предположить, что гибридизация шла преимущественно

однонаправлено – между самками *T. hakonensis* и самцами *T. brandtii*. Важно отметить, что *T. brandtii* хорошо приспособлен к океанической солености и ведет анадромный образ жизни, а *T. hakonensis*, обитающий на Сахалине, в Японии и, по-видимому, в Хабаровском крае (Sakai *et al.*, 2002), всю жизнь проводит в пресной и солоноватой воде, в то время как *T. hakonensis* Приморского края, как и *T. brandtii*, является полупроходным видом. Таким образом, глобальные геолого-климатические изменения на границе третичного и четвертичного периодов, предположительно, обусловили образование нового вида рода *Tribolodon* путем гибридизации между северной формой *T. hakonensis* и *T. brandtii*, что было вызвано необходимостью адаптации к новым условиям окружающей среды, в частности, к морской солености. В результате образовавшийся вид смог занять новую экологическую нишу и дивергировать от родительских видов.

Исходя из того, что у особей с северным типом мтДНК, обитающих в водах Приморья, наблюдаются гены ядерной ДНК, характерные для северной и южной форм, можно сделать предположение о том, что в настоящее время в зоне симпатрии имеет место интрогрессивная гибридизация между представителями южной и северной форм (рис. 14).

У растений явление гибридизации известно давно и считается распространенным механизмом их эволюции. Однако гибридизация у животных, как правило, не рассматривается в качестве важного эволюционного механизма (Майр, 1968). Недавно впервые доказательства видообразования путем гомоплоидной гибридизации, сопровождающегося адаптацией к экстремальным условиям среды, были показаны у бабочек (Gompert *et al.*, 2006). Гомоплоидная гибридизация представляет собой гибридизацию без изменения числа хромосом и обусловлена необходимостью приспособления к новой экологической нише (Gross, Riesenber, 2005). Колонизация нового места обитания позволяет зарождающемуся гибриднему виду избежать интрогрессии и конкуренции с родительскими видами. Кариологические исследования по сравнению южной и северной форм *T. hakonensis* не проводились. Однако известно, что *T. brandtii* (Фролов, 1975), *T. hakonensis* и *T. sachalinensis* (Itoh, Niiyama, 1972), как и большинство карповых, имеют диплоидный набор из 50 хромосом, причем в их кариотипах не обнаруживают каких-либо видимых различий. Поэтому подобный тип видообразования южной формы крупночешуйной красноперки представляется наиболее вероятным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетический анализ выявил высокий уровень различий в мтДНК всех исследованных видов. Полученные в настоящей работе данные по ПЦР-ПДРФ-анализу мтДНК и секвенированию гена COI могут служить для идентификации видов.

Установлено, что ПЦР-ПДРФ-анализ имеет лучшее разрешение для построения филогении по сравнению с анализом последовательностей нуклеотидов COI. Это объясняется размером и разной разрешающей способностью исследованных сегментов мтДНК для филогенетического анализа. В ПЦР-ПДРФ-анализе использовались протяженные участки мтДНК, кодирующие как консервативные (12S/16S рРНК), так и переменные гены (A6/A8/COIII,

ND3/ND4L/ND4 и ND5/ND6, причем в обеих группах рыб наибольшая изменчивость выявлена в ND-генах), тогда как последовательности COI короткие, консервативные, а также часто характеризуются насыщением в 3-й позиции кодонов, экранирующим филогенетический сигнал. Однако COI имеет несомненные преимущества при штрих-кодировании, так как с помощью этого метода можно относительно легко и безошибочно дифференцировать не только виды, но и во многих случаях внутривидовые единицы.

Уровни дивергенции между видами одного рода у кефалевых (*Liza* и *Chelon*) и карповых (*Tribolodon* и *Pseudaspius*) характеризуются сходными величинами – 7.9-16% и 2.5-5.3-11.5% соответственно. Уровень дивергенции у кефалевых выше, что, по-видимому, свидетельствует об их более древнем происхождении и подтверждается данными палеонтологии (Berg, 1958, цит. по: FishBase, www.fishbase.org; Никольский, 1971). Основные этапы дивергенции средиземноморской группы видов *Liza* и *Chelon*, а также *L. haematocheilus* и *L. subviridis* совпадают с таковыми у *T. hakonensis*, *T. brandtii*, *T. sachalinensis* и *P. leptcephalus* (11-16 млн. лет назад, что соответствует 8-11% нуклеотидной дивергенции). Период радиации этих видов соответствует среднему миоцену, характеризовавшемуся глобальными геологическими изменениями, приводившими к изоляции, а также изменению условий окружающей среды, обуславливая таким образом дивергентную эволюцию этих рыб. Похожая неоднородность во временном континууме видообразования наблюдается также у тихоокеанских лососей и тайменей (роды *Oncorhynchus*, *Huho*) – приблизительно 7% (Shed'ko *et al.*, 1996), терпугов (*Hexagrammos*) – 7% (Брыков, Подлесных, 2001), гольцов (*Salvelinus*) 7.5 – 10% (Олейник и др., 2003; Oleinik *et al.*, 2007), корюшек (*Hypomesus*) – 11% (Скурихина и др., 2004). Исходя из гипотезы «молекулярных часов» можно предположить, что в истории Земли были периоды с высокой вероятностью видообразования, которые характеризовались значительными геологическими и климатическими изменениями.

Уровень дивергенции, наблюдаемый между аллопатричными выборками *M. cephalus* Японского vs. Азовского и Средиземного морей (4.5% по данным ПЦР-ПДРФ), а также между выборками япономорского, азово-средиземноморского vs. тайваньского лобана (4-5% по данным секвенирования COI), оказался очень высоким. Однако, несмотря на это, а также на достоверные морфологические различия, наблюдаемые между географически удаленными популяциями (Corti, Crosetti, 1996), принадлежность их к виду *M. cephalus* не оспаривается ни морфологами, ни генетиками (Corti, Crosetti, 1996; Thomson, 1997; Rossi *et al.*, 1998a, b), хотя некоторые авторы считают его комплексом подвидов (Schultz, 1949; Briggs, 1960). В связи с тем, что внутривидовая структурированность *M. cephalus* очевидна, можно предположить, что эти популяции находятся на стадии зарождающихся по типу аллопатрического видообразования видов.

В противоположность этому, уровень дивергенции между двумя самостоятельными видами дальневосточных красноперок (южная и северная формы *T. hakonensis*) почти в половину меньше и составляет 2.5%. Это подтверждает предположение о том, что при симпатрическом видообразовании новые виды образуются быстро (Майр, 1968). Полученные данные дают основание полагать, что географическое видообразование не является «почти единственным» способом

видообразования у животных, и что экологическое видообразование с участием гибридизации не так редко в природе, как считали основатели СТЭ (Майр, 1968; Dobzhansky, 1970).

ВЫВОДЫ

1. С использованием молекулярно-филогенетического анализа мтДНК исследованы эволюционные взаимоотношения и филогенетическая структура у представителей семейств Mugilidae и Cyprinidae. Установлено, что ПЦР-ПДРФ-анализ имеет лучшее разрешение для построения филогении по сравнению с анализом коротких последовательностей нуклеотидов гена COI.

2. Показан высокий уровень различий в мтДНК исследованных видов. Полученные в настоящей работе данные по ПЦР-ПДРФ-анализу мтДНК и секвенированию гена COI могут служить точными диагностическими маркерами для таксономических, эволюционных и рыбохозяйственных целей у исследованных видов семейств Mugilidae и Cyprinidae.

3. Показано, что в семействе Mugilidae род *Chelon* не является монофилетическим. Рекомендована таксономическая ревизия и синонимизация родов *Liza* и *Chelon*. Согласно приоритету, виды *Liza* следует отнести к роду *Chelon*. Между аллопатричными популяциями *M. cephalus* Японского и Азовско-Средиземного морей и о. Тайвань выявлен высокий уровень дивергенции, что указывает на целесообразность установления подвидового статуса для этих популяций.

4. В семействе Cyprinidae выявлено близкое родство родов *Tribolodon* и *Pseudaspius*. Установлено, что дивергенция этих родов от общего предка имела место в позднем олигоцене, когда на месте Японского моря существовало пресноводное палео-Японское озеро. Дивергенция *P. leptcephalus*, *T. hakonensis*, *T. brandtii* и *T. sachalinensis* произошла в середине миоцена, когда мощная трансгрессия уровня океана привела к поступлению соленой воды в палео-Японское озеро. Дивергенция *T. nakamurai* имела место в конце миоцена.

5. Изучена популяционно-генетическая структура трех видов красноперок *T. sachalinensis*, *T. brandtii* и *T. hakonensis* на значительной части их ареала. Показано, что внутривидовая подразделенность в большей степени выражена у видов, жизненный цикл которых более тесно связан с пресными водоемами.

6. При исследовании популяционно-генетической структуры у *T. hakonensis*, обнаружено, что этот вид представлен двумя формами: северной (Хабаровский край, Сахалин, Япония) и южной (Приморье, Южная Корея), значительно отличающимися генетически. Время их дивергенции датируется поздним плиоценом.

7. Анализ мтДНК и ядерных генов показал, что южная форма *T. hakonensis* представляет собой самостоятельный вид, образовавшийся более 4 млн. лет назад в результате гибридизации истинного *T. hakonensis* (северной формы) и мелкочешуйной красноперки *T. brandtii*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Семина А.В. Рестриктазный анализ фрагмента митохондриальной ДНК у двух видов красноперок рода *Tribolodon* (Pisces, Cyprinidae) // Фундаментальные исследования морской биоты: Биология, биохимия и биотехнология, Владивосток, 1-2 октября 2002 г.: Материалы конференции НОЦ ДВГУ «Морская биота». Владивосток: Изд-во Дальневосточного ун-та, 2002. С. 89.
2. Semina A.V. Genetic differentiation of *Tribolodon hakonensis* and *T. brandti* based on PCR-RFLP of mitochondrial DNA fragments // Marine Environment: Nature, Communication and Business, Vladivostok, Russia, June 2, 2003: Abstracts International Conference. Busan: Korea Maritime University, 2003. P. 39.
3. Semina A.V., Polyakova N.E., Brykov V.I.A. Genetic divergence in daces of the *Tribolodon* genus (Teleostei: Cyprinidae) from Far Eastern Seas // 14th Annual PICES Meeting, Vladivostok, Russia, September 29 – October 9, 2005: Abstracts. Sidney, British Columbia, Canada: PICES Publisher, 2005. P. 109.
4. Semina A.V. Molecular evolution of the endemic genus *Tribolodon* species (Teleostei: Cyprinidae) caused by paleoenvironmental changes in the Western North Pacific region // 4th International Symposium “Promoting Environmental Research in Pan-Japan Sea Area”, Kanazawa, Excel Hotel Tokyu, Japan, March 8-10, 2006: Abstract. Kanazawa: Kanazawa University, 2006. P. 89.
5. Семина А.В., Полякова Н.Е., Брыков Вл.А. Генетический анализ выявляет криптический вид у дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* // Доклады Академии Наук. 2006. Т. 407, № 4. С. 571-573.
6. Семина А.В., Полякова Н.Е., Махоткин М.А., Брыков Вл.А. Дивергенция митохондриальной ДНК и филогенетические отношения кефалей Японского и Азовского морей на основе ПЦР-ПДРФ-анализа // Биология моря. 2007а. Т. 33, № 3. С. 223-228.
7. Semina A.V., Polyakova N.E., Brykov V.I.A. Phylogenetic relationships of Mugilids from the Sea of Japan, Azov and Mediterranean Seas // XII European Congress of Ichthyology, Cavtat (Dubrovnik), Croatia, September 9-13, 2007: Book of abstracts. Zagreb, Croatia: TIPOMAT doo, 2007. P. 48.
8. Семина А.В., Полякова Н.Е. Биоразнообразие, эволюция и филогеография ихтиофауны Японского моря и сопредельных вод на основе анализа молекулярных маркеров // Материалы Российско-Корейского семинара молодых ученых по науке и технологии, Новосибирск, 17-20 сентября 2007 г. Новосибирск: Изд-во НГТУ, 2007. С. 124-130.
9. Семина А.В., Полякова Н.Е. Молекулярная эволюция рода *Tribolodon* (Pisces: Cyprinidae) и ее связь с палеогеологическими событиями в северо-западной Пацифике // Современные проблемы биологической эволюции, Москва, 17-20 сентября 2007 г.: Материалы конференции. К 100-летию Государственного Дарвиновского музея. М: Изд-во ГДМ, 2007. С. 69-70.
10. Семина А.В., Полякова Н.Е., Брыков Вл.А. Анализ митохондриальной ДНК: таксономические и филогенетические отношения в двух таксонах рыб (Pisces: Mugilidae, Cyprinidae) // Биохимия. 2007b. Т. 72, № 12. С. 1666-1673.

Алиса Владимировна СЕМИНА

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ В ДВУХ
ГРУППАХ РЫБ СЕМЕЙСТВ MUGILIDAE И CYPRINIDAE**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук