

Phylogeography of Mitochondrial DNA in South Asian Dolly Varden Char *Salvelinus curilus* Pallas, 1814 (Salmoniformes, Salmonidae): Mediated Gene Introgression?

S. V. Shedko, L. K. Ginatulina, I. L. Miroshnichenko, and G. A. Nemkova

Institute of Biology and Soil Science, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia;
fax: (4232) 31-01-93; e-mail: shedko@ibss.dvo.ru

Received April 19, 2006

Abstract—In 41 individuals of South Asian Dolly Varden char *Salvelinus curilus*, nucleotide sequences of tRNA-Pro gene fragment (27 bp) and mtDNA control region (483–484 bp) were analyzed. The fish were collected in 20 localities covering virtually the whole range of the species: Kuril Islands, Sakhalin Island, and Primorye. In addition, six individuals of three other char species (*S. albus*, *S. malma*, and *S. leucomaenis*), which are closely related to *S. curilus* and inhabit the Russian Far East, were examined. In all, we detected 12 different variants of mtDNA haplotypes that formed three distinct groups differing in 14–20 nucleotide positions. The first group consisted of six haplotypes found in *S. curilus* in Kuril Islands, Sakhalin, and Primorye (mtDNA phylogroup OKHOTSKIA). The second group comprised four haplotypes representing the mtDNA phylogroup BERING, which had been described earlier (Brunner et al, 2001); they were found in *S. curilus* in Kuril Islands and Sakhalin, as well as in *S. albus* and *S. malma* in Kamchatka and northern Kurils. The third group included two haplotypes detected in *S. leucomaenis*. The existence of two mtDNA lineages (OKHOTSKIA and BERING) in *S. curilus* from Kurils and Sakhalin was explained by hybridization and mtDNA transfer from *S. malma* to *S. curilus*. The absence of the BERING haplotypes in *S. curilus* from Primorye water reservoirs is related to the physical isolation of the Sea of Okhotsk and Sea of Japan basins in past epochs. On the basis of comparing phylogenetic trees, constructed from the data on allozyme and mtDNA variation, we suggest that in this case, a mediated transfer of mtDNA in Alpinoid chars → *S. malma* → *S. curilus* chain could occur.

DOI: 10.1134/S1022795407020111

INTRODUCTION

South Asian Dolly Varden char *Salvelinus curilus* Pallas, 1814 was described by P.S. Pallas under the name of *Salmo curilus* on the basis of analysis of by several char individuals from Kuril Island streams. This char form has recently received the rank of species, with junior synonyms of its name *Salmo laevigatus* Pallas, 1814; *Salmo fariopsis* Kner, 1870; and *S. malma krascheninnikovi* Taranetz, 1933 (see [1–5]). As most char species from the genus *Salvelinus*, South Asian Dolly Varden char exhibits high morphological variability and has both anadromous and strictly freshwater (resident) ecotypes, the proportion of which in the populations varies depending on their geographic position and other abiotic factors. The range of *S. curilus* covers Shantar and Kuril Islands, Sakhalin, Hokkaido, the continental coast from the Amur River mouth to North Korean rivers, and some water bodies of the Ussuri River, Khanka Lake, and the Yalu River basins. South Asian Dolly Varden char is assigned to the morphologically similar malmoid species group of chars from the genus *Salvelinus*, which includes, in addition to *S. curilus*, typical Dolly Varden char *S. malma* Walbaum,

1792; South American Dolly Varden char *S. lordii* Günther, 1866; white char *S. albus* Glubokovsky, 1977; long-headed char *S. kronocius* Viktorovsky, 1978, and other char species related to Dolly Varden (see [1]). Malmoid chars are widely spread in the South Pacific, where they dominate over the members of Alpinoid *Salvelinus* char group, which in this region is rather infrequent. The latter group is taxonomically and ecologically highly variable in the water bodies of the Arctic Ocean basin and includes Arctic char *S. alpinus* L., Taranetz char *S. taranetzi* Kaganowsky, 1955; *S. oquassa* Girard, 1854; and other species close to *S. alpinus*.

Earlier, in analysis of samples of South Asian Dolly Varden from Primorye rivers, Sakhalin, Kuril Islands, and Dolly Varden from Kamchatka, two distinct lineages of mitochondrial DNA (mtDNA) were found [6]. Only one of these lineages (Primorye variants) was detected in the *S. curilus* samples from Primorye. The other mtDNA lineage (Kamchatka variants) was found in Dolly Varden char *S. malma* and white char *S. albus* from the Kamchatka River basin (Kamchatka Peninsula). Both lineages were present in some *S. curilus* samples from the rivers of southern Sakhalin and South

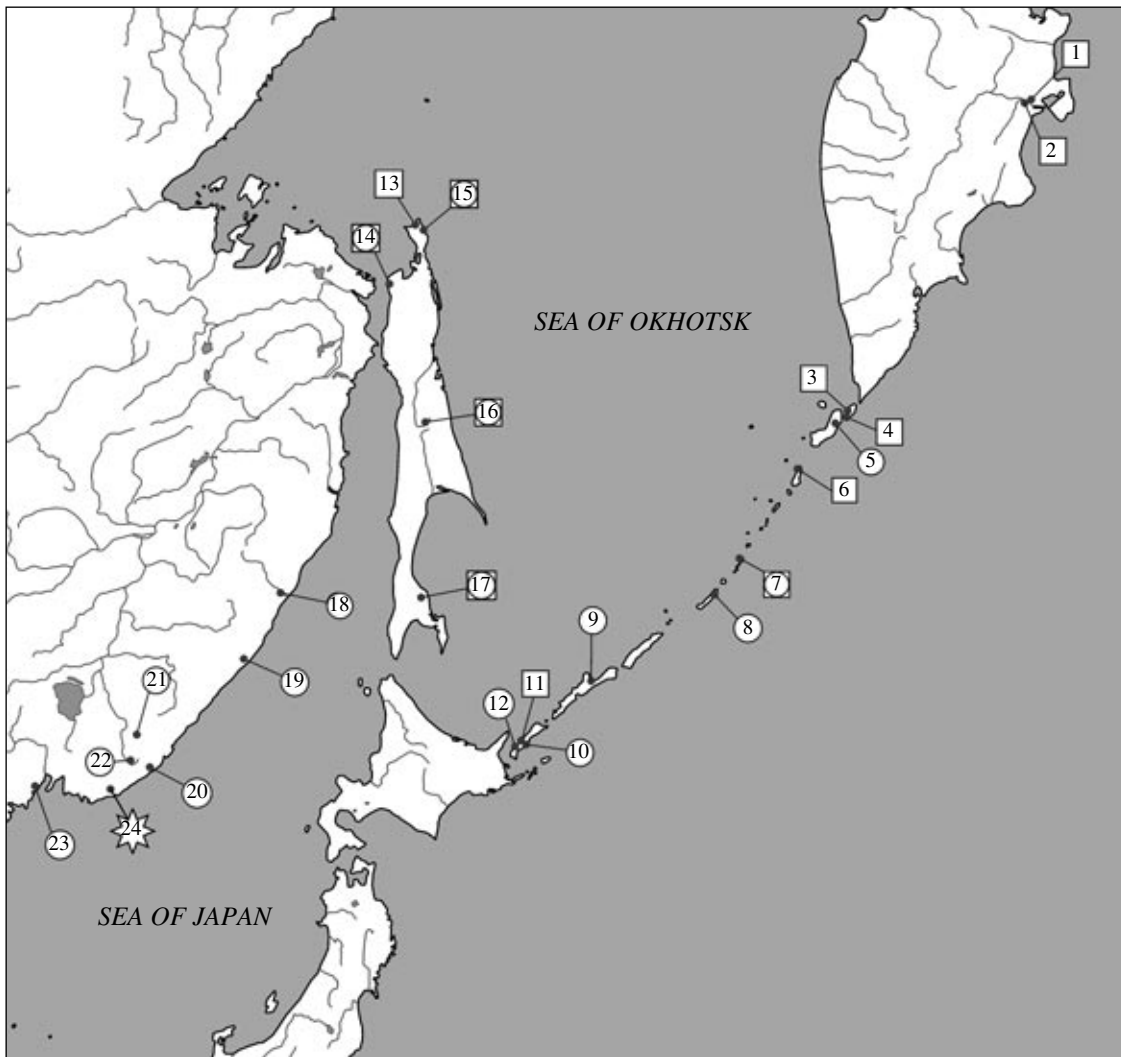


Fig. 1. Schematic map of the sampling localities (see Table 1 and text for sample designations).

Kurils. Other authors, after revising the initial interpretation of their data [7], also recorded two mtDNA lineages in some South Asian Dolly Varden chars from Sakhalin Island rivers [8].

The aim of the present study was identifying the mtDNA variants of South Asian Dolly Varden char and establishing their position in the total picture of mtDNA variation in Alpinoid and malmoid chars from the genus *Salvelinus* (see [9]) on the basis of sequence analysis of the mitochondrial genome control region fragment.

MATERIALS AND METHODS

As the material, we used part of the collection of mitochondrial or total DNA preparations, which were made at different times by means of alkaline [10] or standard phenol–chloroform [11] methods, using fresh or ethanol-fixed liver tissue samples taken from four

char species from different regions of the Russian Far East (Fig. 1, Table 1).

A fragment of the char mitochondrial genome, totally covering its control region, was amplified in polymerase chain reaction (PCR) using forward LRBT-25 (5'-AGA-GCG-CCG-GTG-TTG-TAA-TC-3') and reverse LRBT-1195 (5'-GCT-AGC-GGG-ACT-TTC-TAG-GGT-C-3') primers [13], specific to the flanking transport RNA (tRNA-Thr and tRNA-Phe) genes. Amplification was run in a UNO-Thermoblock device (Biometra, Germany) in 50 μ l of a reaction mixture including 10–20 ng of mtDNA (or 1–2 μ g of total DNA), 5 μ l of buffer (0.6 M Tris-HCl, pH 8.5; 0.015 M MgCl₂; 0.25 M KCl; 0.1 M 2-mercaptoethanol; 1% Triton X-100), 5 μ l of the sum of deoxytriphosphates from 8 mM solution, 5 μ l of each primer from 2 μ M solutions, 2.0–2.5 u *Taq* polymerase (SibEnzim, Novosibirsk, Russia), and deionized water. PCR was run in the following regime: initial denaturing at 96°C for 60 s; 30 amplification

Table 1. Sample numeration, geographic locality, and sample sizes (*n*)

No.	Char species, locality and date of sampling	<i>n</i>
White char <i>S. albus</i> Glubokovsky, 1977		
1	Raduga River, Kamchatka River basin, Kamchatka Peninsula (Sept. 18, 1998)	3
Dolly Varden char <i>S. malma</i> Walbaum, 1792		
2	D'yakonovskii Spring, flowing into Azabach'ya channel, Kamchatka River basin, Kamchatka Peninsula (Sept. 19, 1998)	1
3*	Channel of Bol'shoe Lake, Shumshu Island, Kurils (July 31, 1999)	2
South Asian Dolly Varden char <i>S. curilus</i> Pallas, 1814		
4	Unnamed spring near Baikovo village, Shumshu Island, Kurils (July 29, 1999)	2
5	Unnamed spring in Rifovaya Bight, Paramushir Island, Kurils (July 30, 1999)	2
6*	Unnamed spring in Nemo Bight, Onekotan Island, Kurils (July 24, 1999)	1
7*	Unnamed spring flowing into southern Tikhoe Lake, Rasshua Island, Kurils (Aug. 4, 1999)	2
8*	Unnamed spring in Dushnaya Bight, Simushir Island, Kurils (Aug. 9, 1999)	2
9*	Pioner R., Kuibyshevskii Bay, Iturup Island, Kurils (Aug. 13, 1999)	1
10	Unnamed spring near Otradnoe village, Kunashir Island, Kurils (Aug. 16, 1999)	1
11	Unnamed spring near Stolbchatyi Cape, Kunashir Island, Kurils (Aug. 17, 1999)	1
12	Alekhin R. in Alekhin Bight, Kunashir Island, Kurils (Aug. 18, 1999)	1
13	Toi R., Severnyi Bay, Shmidt Peninsula, Sakhalin Island (Aug. 5, 2001)	1
14	Tum' R., Shmidt Peninsula, Sakhalin Island (Aug. 9, 2001)	2
15	Taliki R., Shmidt Peninsula, Sakhalin Island (Aug. 14, 2001)	2
16	Upper Tym' R., Sakhalin Island (Aug. 2, 2002)	3
17	Belaya R., Naiba R. basin, Sakhalin Island (Sept. 10, 1999; July 14, 2002)	3
18	Samarga R., Primorskii Krai (June 11, 1992)	2
19	Maksimovka R., Primorskii Krai (Oct. 5, 1998)	2
20	Milogradovka R., Primorskii Krai (July 4, 1996)	2
21	Izvilinka R., Ussuri R. basin, Primorskii Krai (Oct. 29, 1996)	1
22	Upper Ussuri R., Primorskii Krai (Oct. 20, 1995)	2
23	Ryazanovka R. in Peter the Great Bay, Primorskii Krai (July 5, 2000)	4
<i>S. leucomaenis</i> Pallas, 1814		
10	Unnamed spring near Otradnoe village, Kunashir Island, Kurils (Aug. 16, 1999)	1
17	Belaya R., Naiba R. basin, Sakhalin Island (July 14, 2002)	1
18	Samarga R., Primorskii Krai (June 11, 1992)	1
24	Krivaya R., Kievka R. basin, Primorskii Krai (Oct. 10, 1993)	1

* These samples were earlier examined using allozyme analysis [12].

cycles (96°C for 90 s, 56°C for 60 s, 72°C for 90 s), and final elongation at 72°C for 300 s.

The amplification products were purified in Quantum Prep columns (BioRad Laboratories, United States) and subjected to cyclic sequencing using a Big-Dye Terminator kit, version 3.1 (Applied Biosystems, United States), the forward primer (LRBT-25) in one reaction, and an additional inner primer (5'-ATA-TAA-GAG-AAC-GCC-CGG-CT-3') in the other under the following conditions: initial denaturing at 96°C for 300 s and 30 amplification cycles (96°C for 30 s, 55°C for 10 s, 60°C for 240 s). Sequencing was carried out in an ABI Prizm 310 automated sequencer (Applied Biosys-

tems, United States) at the Institute of Biology and Soil Science, Russian Academy of Sciences, Vladivostok. The ABI chromatograms were analyzed and edited if necessary using programs from the Staden 1.53 software package [14]. Various procedures for preparing the sequences for subsequent analysis, including their alignment, were conducted using the MEGA3 package [15].

In total, nucleotide sequences of the 510–511-bp mtDNA fragment were established for 47 char individuals. Differing variants of the sequenced regions were deposited in GenBank/NCBI under accession numbers DQ403177–DQ403188. In addition, we used sequences

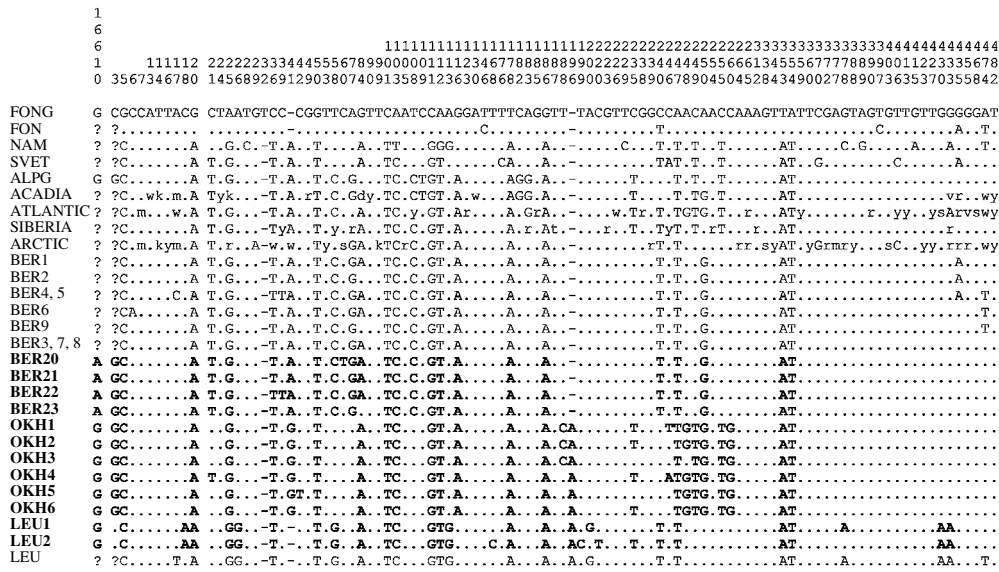


Fig. 2. Variable positions in the 512-bp char mtDNA fragment including fragments of the tRNA-Pro gene (16598–16624) and the control region (1–483). Numeration is given relative to the *S. fontinalis* mitochondrial genome sequence (AF154850 [16]). For the mtDNA phylogroups established earlier (ACADIA, ATLANTIC, SIBERIA, and ARCTIC) [9], consensus sequences are presented, where y = C or T; r = A or G; m = A or C; k = G or T; w = A or T; s = C or G; v = A or C, or G; d = A or G, or T. For phylogroup BERING, individual haplotypes are presented (some variants from the previously determined haplotypes at the mitochondrial genome region examined proved to be identical and were combined). The haplotype found in the present study are set out in bold. Haplotype ALPG is the corresponding region of the mitochondrial genome of *S. oquassa* (AF154851); haplotypes FONG and FON, *S. fontinalis* (respectively AF154850 and AF297987); NAM, *S. namaycush* (AF297989); LEU, *S. leucomaeis* (AF297988); SVET, *Salvethymus svetovidovi* (AF297990).

of homologous mtDNA regions, sequenced by other authors and deposited in GenBank/NCBI under accession numbers AF154850–AF154851 [16] and AF297987–AF298052 [9]. Since all these sequences shared an overlapping region of 481 bp, this region was used in comparative analysis.

The phylogenetic relationships among char mtDNA haplotypes were assessed using three approaches: Bayesian, maximum likelihood, and maximum parsimony methods.

Bayesian phylogenetic analysis was carried out using software program MrBayes, version 3.1.1 [17], concurrently employing two models for different parts of the control region fragment of char mtDNA. For positions without insertions/deletions, Kimura’s two-parametric model of nucleotide substitutions (K2P), accounting for the considerable prevalence transitions over transversions in the mtDNA evolution, and for phylogenetically informative positions with insertions/deletions (nos. 41 and 196, see Fig. 2), the standard discrete model [18]. Monte Carlo analysis using Markov chains (MCMC) was conducted by means of simultaneous launching of four chains (three “hot” and one “cold”) for 5×10^6 cycles and selecting each hundredth of the generated trees. Of 50 000 trees, the first 3000 were discarded, and the remaining ones, which exhibited stable variation of likelihood estimates (LnL), nucleotide substitution model parameters, and tree lengths, were used for constructing a consensus

phylogenetic tree and estimating a posteriori probabilities of its branching.

The heuristic search for maximum likelihood trees (ML trees) was conducted with the PAUP 4.0d81 program [19] based on the K2P model in 30 replications with random addition of sequences in analysis and permutations according to the TBR algorithm. Positions with insertions/deletions were excluded from the matrix. Robustness of the clustering order was assessed by local bootstrap in 10 000 recurrent pseudorandom samples of likelihood estimates (RELL method, program NucML from software package Molphy [20]).

The heuristic search for maximum parsimonious trees (MP trees) was conducted using the PAUP program [19] on the basis of a unweighed data matrix (61 informative character including insertions/deletions) in 100 replications with random addition of sequences in analysis, permutations according to the TBR algorithm, and limiting the maximum possible tree number to 10 000. Robustness of the clustering order was assessed by bootstrap in 1000 pseudorandom replications (PAUP).

The possible variants of mutational transitions between closely related mtDNA haplotypes were visualized by combining the MP trees into phylogenetic networks (UMP [21]).

Homogeneity of the samples by mtDNA haplotype frequencies was assessed using modified χ^2 test [22], in which the probability of accepting a null hypothesis

Table 2. Distribution of the detected haplotypes in 24 char samples

Number	Haplotypes											
Samples	LEU1	LEU2	BER20	BER21	BER22	BER23	OKH1	OKH2	OKH3	OKH4	OKH5	OKH6
Kamchatka Peninsula												
1				1*		2*						
2				1								
Kuril Islands												
3				2*								
4				1		1						
5									1*		1*	
6				1								
7				1						1		
8									1*		1*	
9									1			
10	1*								1			
11				1								
12								1				
Sakhalin Island												
13				1								
14			1*					1				
15				1					1*			
16				1				1	1			
17	1*					1					1	1
Primorskii Krai												
18		1*						2*				
19								1*			1*	
20								2				
21								1				
22								2				
23							2	2				
24		1*										

Note: Haplotypes found in anadromous chars are marked by asterisks.

was estimated from the results of 10 000 pseudorandom permutations (program MONTE from the REAP package [23]).

RESULTS

Sequencing of the fragments of the tRNA-Pro gene (27 bp) and the control mtDNA region (483–484 bp) in 47 individuals of four char species revealed 12 different variants of mtDNA haplotypes (Table 2, Figs. 2, 3). *Salvelinus leucomaenis* and while char *S. albus* had two haplotypes each (LEU1, LEU2 and BER21 and BER23, respectively). In Dolly Varden *S. malma*, one haplotype (BER21), and in South Asian Dolly Varden *S. curilus*, ten haplotypes (BER20–23, OKH1–6) were found. These 12 haplotypes fell into three distinct groups, differing from

one another in 14–20 nucleotide positions: (1) LEU1 and LEU2; (2) BER20–23; and (3) OKH1–6. Within each of the groups, the differences were much lower: one to six nucleotide positions (Fig. 2). Comparison of the sequenced variants with char mtDNA sequences from GenBank/NCBI by the overlapping region (positions from 5 to 485 of the mtDNA control region, in total 481 bp) showed that the group 1 haplotypes were characteristic of *S. leucomaenis* (see Figs. 2, 3 and Table 3). Haplotypes of group 2 were members of the BERING mtDNA phylogroup, which was previously established by Brunner et al. [9] predominantly in *S. malma*. Haplotype BER21 from their mtDNA region did not differ from haplotypes BER3, BER7, and BER8 from [9]. Group 3 haplotypes (OKH1–6) were not reported by

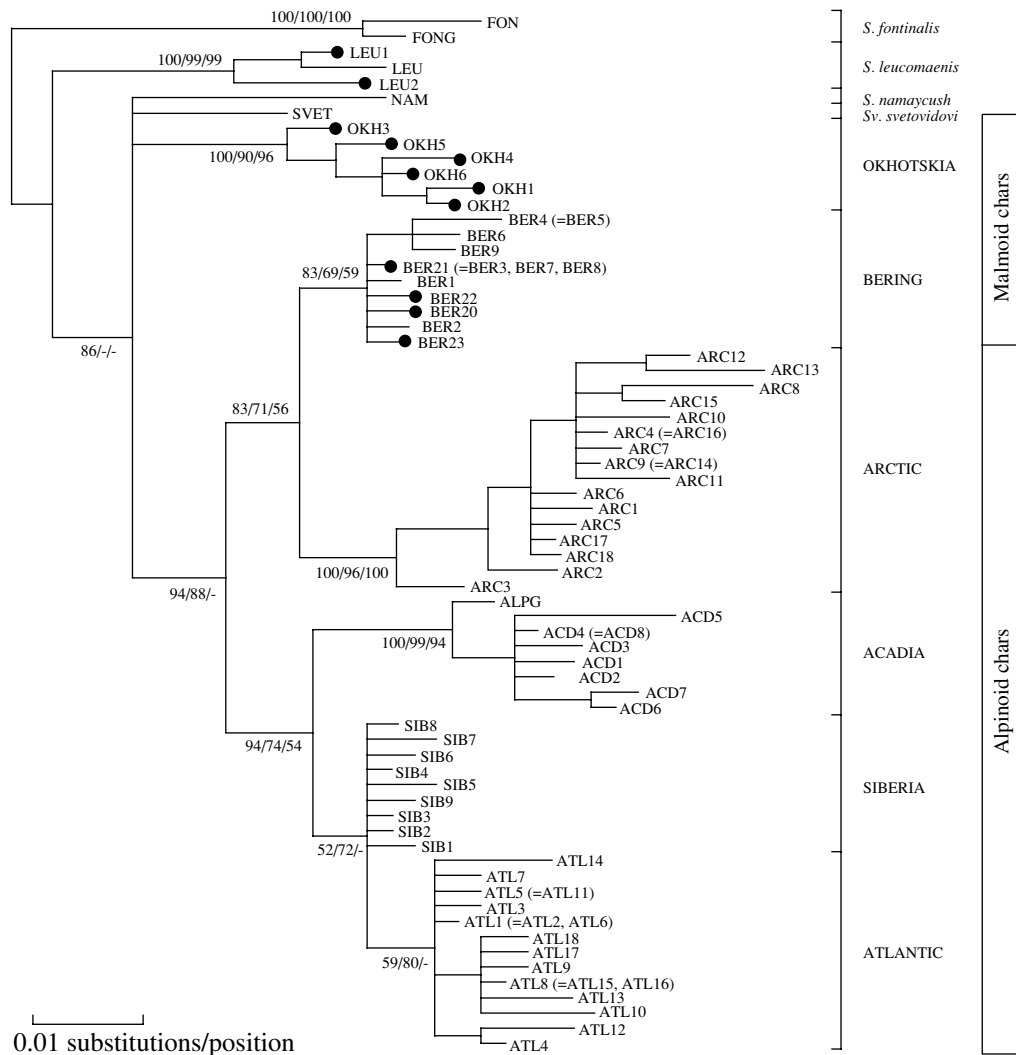


Fig. 3. Bayesian tree (50% consensus of 47 000 trees) of char haplotypes, inferred from analysis of the 481-bp mtDNA control region fragment. Robustness of main clades of Alpinoid and malmoid chars and their phylogenetic relationships is reflected in the estimated of Bayesian a posteriori probabilities (the first numeral), as well as local bootstrap indices for the ML tree (the second numeral) and standard bootstrap indices for the MP tree (the third numeral), which essentially presented the same topology. A dash shows that the reproducibility of the give branching node was lower than a half of all the bootstrap replications. Haplotypes detected in the present study are marked by large dots.

Brunner et al. [9] and composed a novel phylogroup, which we termed OKHOTSKIA.

According to our distance estimates (Table 3), the ATLANTIC and SIBERIA mtDNA phylogroups are closest to one another among the six groups of Alpinoid and malmoid chars. OKHOTSKIA and ACADIA, well differentiated from one another, are at approximately the same distance from the former pair. The ARCTIC phylogroup is the most isolated from all of the other groups, while phylogroups BERING and SVET (*Sv. svetovidovi*) are equidistant from the above five mtDNA phylogroups.

In the Bayesian phylogenetic tree (LnL = -2012.80), the BERING mtDNA phylogroup fell into the same clade with the ARCTIC mtDNA phylogroup; the other clade included phylogroups ATLANTIC, SIBERIA,

and ACADIA (Fig. 3). The haplotype group OKHOTSKIA, as well as haplotype SVET, occupied a basal position relative to these two clades.

A heuristic search based on the maximum likelihood criterion using the K2P model yielded 13 trees with the same likelihood (LnL = -1908.76, the ratio of transition rate to transversions rate, 4.88). As they had virtually the same topology than the tree in Fig. 3, we do not present them here. These 13 ML trees differed only by minor permutations within the BERING and the ATLANTIC groups.

The topology of the tree that represented strict consensus among 10 000 equally parsimonious MP trees (length 148 steps, consistency index CI = 0.51, homoplasy index HI = 0.49, retention index RI = 0.87)

Table 3. Mean number of nucleotide differences (distance K2P, $\times 100$) between the species and (or) phylogroups of Alpinoid and malmoid chars

No.	Species (phylogroup)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<i>S. fontinalis</i>	1.05									
2	<i>S. leucomaenis</i>	5.70	1.27								
3	<i>S. namaycush</i>	5.79	3.36	–							
4	<i>Sv. svetovidovi</i>	5.32	3.66	3.43	–						
5	OKHOTSZIA	5.48	3.71	3.80	2.74	0.57					
6	ACADIA	6.61	5.04	5.03	3.74	3.19	1.06				
7	SIBERIA	6.04	3.47	3.51	2.56	2.58	2.24	0.70			
8	ATLANTIC	6.55	3.84	3.87	3.12	2.38	2.33	1.40	0.80		
9	ARCTIC	6.47	4.51	5.09	3.04	4.52	4.46	3.59	4.24	1.09	
10	BERING	5.15	3.29	4.08	2.75	2.76	2.36	2.05	2.20	2.61	0.54

did not principally differ from the Bayesian tree from Fig. 3 and thereby is not presented here.

Thus, all the three approaches employed (Bayesian, maximum likelihood, and maximum parsimony) ultimately produced the same variant of mtDNA phylogeny of Alpinoid and malmoid chars. Clades of mtDNA phylogroups OKHOTSZIA, ARCTIC, and ACADIA had high support (see Fig. 3), while discreteness of mtDNA phylogroups ATLANTIC and especially SIBERIA was not so evident. The reproducibility of the BERING clade proved to be equal or somewhat lower than the support of the remaining branching points of the tree in Fig. 3 in the tree part that reflects the order of arrangement of all of the above mtDNA phylogroups.

The phylogenetic networks constructed for mtDNA phylogroups OKHOTSZIA and BERING (Fig. 4) showed a specific character of nucleotide substitutions in the examined fragments of the char mtDNA control region. Any of the five maximum parsimonious trees, derived for the OKHOTSZIA group, included recurrent and reverse substitutions at the same nucleotide positions. The phylogenetic network of the BERING group haplotypes, combining 181 MP trees, also permitted multiple homoplastic nucleotide substitutions.

The central position in the OKHOTSZIA phylogenetic network was occupied by haplotypes OKH2 and OKH6 (had three connecting branches each). The OKH2 haplotype is wide spread (Primorye, Sakhalin, and southern Kuril Islands) and predominated in frequency in South Asian Dolly Varden char from Primorye. The second haplotype was recorded only once, in southern Sakhalin. Of the three remaining haplotypes, two are rare and found in a small number only in southern Primorye (OKH1) and middle Kurils (OKH4), whereas the other two haplotypes (OKH3 and OKH5) are rather widely spread from southern Primorye to northern Kuril Islands.

The center of the phylogenetic network of the BERING mtDNA phylogroup is occupied by a haplotype

which is often, as compared to other haplotypes from this group, represented in samples of South Asian Dolly Varden. This haplotype is BER21 (five connecting branches). Apart from South Asian Dolly Varden, we have found this haplotype in Dolly Varden and white char from Kamchatka. Judging by literature evidence [9], this variant also occurs in Dolly Varden from Chukotka and South American Dolly Varden *S. lordii* in Alaska (haplotype BER21 in the region examined does not differ from haplotypes BER3, BER7, and BER8 from the cited study). The BER23 haplotype, characterized by three connecting branches in the phylogenetic networks, was found in white char from Kamchatka and in South Asian Dolly Varden from northern Kurils.

Several haplotypes, earlier reported by Brunner et al. [9] in white char (BER1) and Dolly Varden (BER2) from Kamchatka, in Dolly Varden from Alaska (BER6 and BER9), in (South?) Dolly Varden from Paramushir Island (BER4–5), were not found in our samples. All of them, excluding the former, occupy peripheral positions in the BERING mtDNA phylogroup phylogenetic network. Two rare haplotypes that we found in a few individuals of South Asian Dolly Varden from the north (BER20) and south (BER22) Sakhalin can be also assigned to peripheral ones.

In general, there are clear interregional differences in mtDNA haplotype frequency between the samples of South Asian Dolly Varden from Primorye, on the one hand, and from Sakhalin and Kurils, on the other (Table 2). In the South Asian Dolly Varden samples from Sakhalin and Kurils, both mtDNA phylogroups (BERING and OKHOTSZIA) are presented¹. The mtDNA haplotype frequencies in the combined samples from these two

¹ Note that in the samples including haplotypes of the both mtDNA phylogroups, preparations for sequencing were selected on the results of their preliminary genotyping using RFLP analysis of the total mitochondrial genome or its fragment encoding NADH subunits 5 and 6. Consequently, frequencies of the two mtDNA phylogroups in these samples (see Table 2) do not reflect their actual proportions (these data will be published elsewhere).

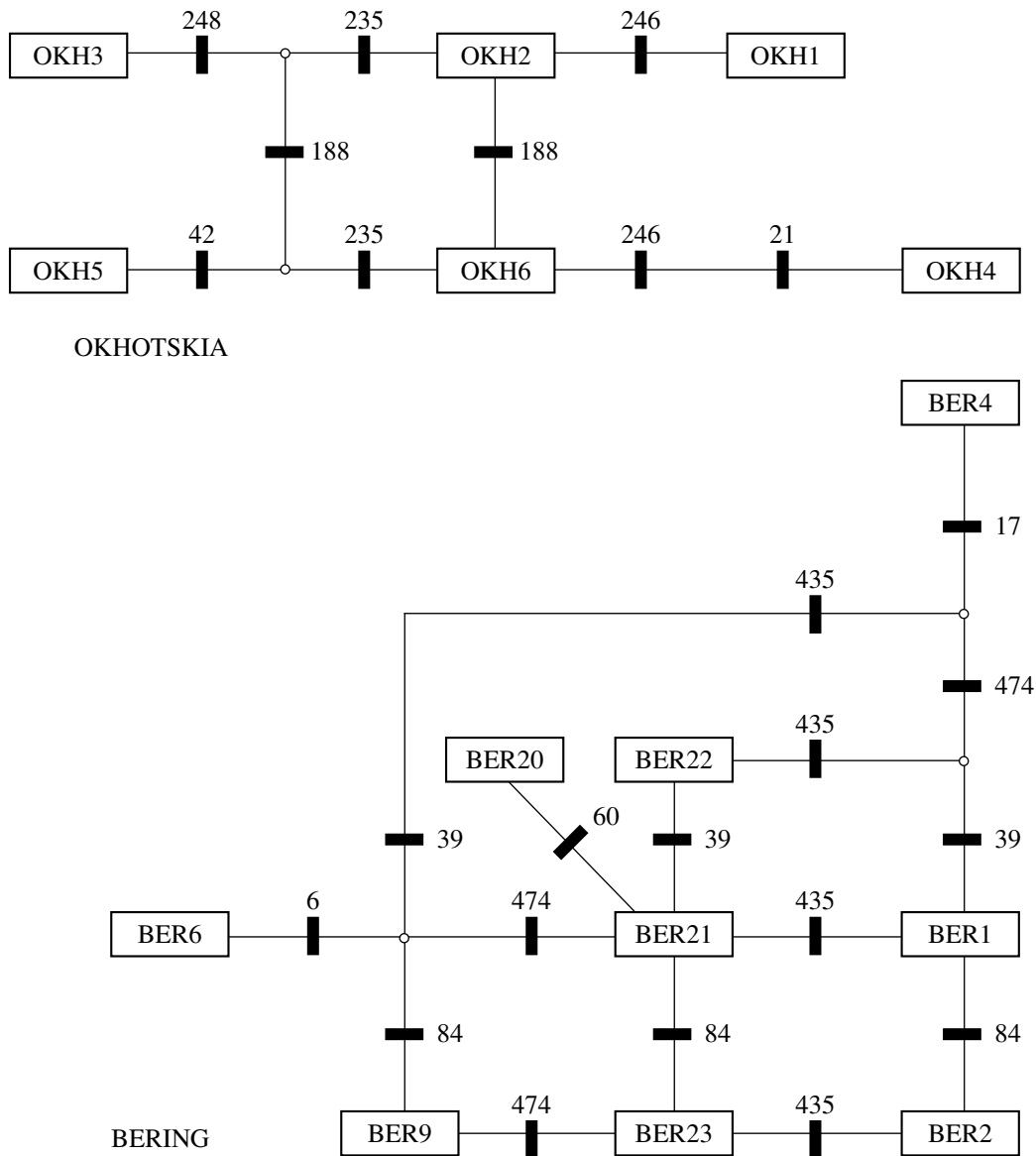


Fig. 4. Phylogenetic networks of mtDNA phylogroups OKHOTSKIA and BERING, obtained by combining the most parsimonious trees (UMP [21]). Numerals show positions of nucleotide substitutions in the char mtDNA control region (see Fig. 2).

regions are homogeneous ($\chi^2 = 6.35$, $d.f. = 8$, $P = 0.86$). In Primorye, haplotypes of the BERING mtDNA phylogroup were not recorded, and in haplotype frequencies of the OKHOTSKIA mtDNA phylogroup, the combined South Asian Dolly Varden sample from Primorye and the combined sample from Sakhalin and Kuril Island are heterogeneous ($\chi^2 = 14.75$, $d.f. = 5$, $P = 0.001$).

DISCUSSION

To date, based on analysis of the left hypervariable domain of the mtDNA control region of Alpinoid and malmoid chars from the genus *Salvelinus*, several mtDNA evolutionary lineages have been distinguished.

These lineages have a certain degree of geographic affiliation and to a certain extent of success mark various forms and species of chars or their groups ([9], present communication).

MtDNA phylogroup haplotypes ATLANTIC and SIBERIA are widespread in the western sector of Arctic from the Labrador Peninsula to the East Siberia water reservoirs belonging to the Lena River basin. They were recorded in Arctic char *S. alpinus* and in other Alpinoid char species and forms, inhabiting this area.

A comparatively compact haplotype group ACADIA occurs in Canadian provinces Quebec and New Brunswick, where it was detected mostly in *S. oquassa*. Apart from *S. oquassa*, haplotypes of this mtDNA lineage were also registered in two populations of *S. fon-*

tinalis Mitchell, 1814 and *S. namaycush* Walbaum, 1792, in which they have completely replaced the mtDNA variants characteristic of these species [24, 25]. The haplotype, which in the present work is designated ALPG, is a variant of the *S. oquassa* mitochondrial genome, which was transferred to *S. fontinalis* via hybridization between these species (see [16]).

Haplotypes of the ARCTIC mtDNA phylogroup are common in eastern Arctic sector from Chukotka to Labrador. They are found mostly in Alpinoid chars from this region: Taranetz char *S. taranetzi*; close to it (if not the same, see [26]) eastern form *S. alpinus*; *S. elgyticus* Viktorovsky and Glubokovsky, 1981, and *S. boganidae* Berg, 1926. An exception is a single finding of haplotype ARC17 in *S. malma* from Galbraith Lake, located in the zone of overlapping ranges of Alpinoid and malmoid chars in Alaska.

Haplotypes of the BERING mtDNA phylogroup are recorded in Chukotka (in *S. malma*), Alaska (in *S. malma* and *S. lordii*), Kamchatka (in *S. malma* and *S. albus*), Kuril Islands (in *S. malma* and *S. curilus*), and Sakhalin (in *S. curilus*). The results of the present work and the study by Brunner et al. [9] can be compared to the results of RFLP analysis of mtDNA [27, 28], as part of the chars examined was collected in the same localities (the Belaya River near the Sokol Biological Station, Sakhalin; the Kamchatka River near the Raduga Biological Station, Kamchatka Peninsula). Based on this, it is likely that the BERING group occur also in the northern part of the Sea of Okhotsk (in *S. malma*).

Distribution of the OKHOTSKIA haplotypes (Primorye variants or southern haplotypes in studies [6, 8, 28]) nearly coincides with the *S. curilus* range—Kuril Islands, Sakhalin Island, and Primorye, including the populations from the upper Ussuri River, isolated from the main part of the range (see Fig. 1, where samples with haplotypes of the OKHOTSKIA group are designated by dots, and those with haplotypes of the BERING group, by squares). Beyond the South Asian Dolly Varden range, the OKHOTSKIA haplotypes were found only in a few *S. malma* sample from the rivers of the northern coast of the Sea of Okhotsk, in which their frequencies do not exceed 10% (calculated from the data presented in [27–30]). Moreover, there is some evidence indicating that the mtDNA variant characteristic of *S. curilus* and detected by means of sequencing a cytochrome b gene fragment, was found in one *S. malma* individual from the Vilyuchinskii stream in southeastern Kamchatka [30, 31]. However, this finding does not comply with the earlier results of RFLP analysis of this Dolly Varden sample [29], which requires verification.

Among the above mtDNA phylogroups, BERING and OKHOTSKIA have the largest area of geographical overlapping. Since their occurrence mainly coincides with the ranges of respectively *S. malma* and *S. curilus*, it seems that the formation of the BERING and OKHOTSKIA mtDNA phylogroups was associ-

ated with the isolation and subsequent evolution of these char species. The mixed composition of the *S. curilus* mitochondrial gene pool is likely caused by hybridization of this species with *S. malma*, resulting in mtDNA transfer from *S. malma* to *S. curilus* [3, 4, 8]. In this connection, we should like to note that the characteristic S-shaped cline of frequencies of the vertebra numbers and other meristic diagnostic traits, observed in the contact zone of *S. malma* and *S. curilus* in northern Kurils [4, 32], may serve as indirect evidence hybridization between these species has occurred in the past or is occurring in the present. Apparently, exactly this factor resulted in some merging of their morphological discreteness here. The presence of transitive from *S. curilus* to *S. malma* populations in northern Kurils is documented by other morphological data [33] and by the results of allozyme studies [12]. In general, it seems likely that the north Kuril region is a hybridization zone of these char species.

A question arises as to why the overlapping region of the geographic distribution of the OKHOTSKIA and BERING haplotypes is not limited to the contact zone of *S. curilus* and *S. malma* (northern Kurils, the Sea of Okhotsk coast to the north of the Uda River mouth), extending for more than 1000 km along the Kuril Archipelago and Sakhalin Island?

Thus may be explained by an unstable geographic position of their hybridization zone in time. Apparently, in the past the ranges of *S. curilus* and *S. malma*, as those of many other fish species, were changing, following climatic changes. During Pleistocene climatic coolings, the ranges of these char species expanded or shifted to the south; in the periods of warming, to the north. If this explanation is true, then the area of BERING haplotypes within the *S. curilus* range may reflect the boundaries of the southward movement of the hybridization zone. This means that, in our view, in the periods of maximal cooling this zone could be situated in the southern region of Sakhalin and the Kuril Archipelago. It is possible that it is isolation of the Sea of Okhotsk and Sea of Japan basins during the sea level regressions, occurring during the periods of climatic cooling (the coastline of this region in [34]), prevented penetration of the BERING group haplotypes into the *S. curilus* mitochondrial gene pool from the Primorye water bodies (all 164 individuals of South Asian Dolly Varden, examined by means of mtDNA RFLP method, carries the OKHOTSKIA lineage haplotype [6; our unpublished data]). The difference between the Primorye and the Sakhalin–Kuril samples of *S. curilus* in the haplotype composition of the OKHOTSKIA mtDNA phylogroup can be explained in a similar manner.

Since a few *S. malma* individuals in rare cases were fixed in the rivers of northeastern Hokkaido, far from the southern boundaries of the Dolly Varden range (see [3] for references), hybridization with such migrant fish is another factor that could have contributed to the

extension of the geographic overlapping zone of the ranges of these mtDNA phylogroups [3, 4, 8].

Considering the pattern of phylogenetic relationships between the char mtDNA phylogroups, one cannot miss the following fact. In the phylogenetic trees, based on allozyme data, Alpinoid chars constitute a monophyletic group relative to malmoid chars [27, 35–37]. However, in all variants of phylogenetic trees, based on sequencing of parts of the mitochondrial genome ([9, 30, 31, 38], see also Fig. 3), the Alpinoid chars formed a paraphyletic group, because mtDNA variants, characteristic for *S. malma*, were always positioned within the haplotype clade of Alpinoid chars. The mtDNA variants characteristic of South Asian Dolly Varden char occupied a basal phylogenetic position relative to the remaining haplotype groups found in malmoid and Alpinoid chars ([30, 31], the present study).

This finding suggests that native for *S. malma* mtDNA could be completely or partially substituted by foreign mtDNA, received by this species or its ancestral form from Alpinoid chars in one or several hybridization events. Thus, in our view, a two-stage scenario of mediated mtDNA introgression to the mitochondrial gene pool of *S. curilus* is plausible. At the first stage, mtDNA was transferred from a member of the Alpinoid char group to *S. malma*. The foreign mtDNA gave rise to the phylogroup BERING, which in time became predominant in the *S. malma* mitochondrial gene pool. At the second stage, hybridization between *S. malma* and *S. curilus* resulted in an introduction of the BERING haplotypes into the. In this case, rare mtDNA variants, typical for *S. curilus*, which were revealed in the mitochondrial gene pool of *S. malma* from the northern Sea of Okhotsk, may be regarded as the traces of their past wider abundance in the latter species.

Ample evidence indicate that interspecies introgressive hybridization, accompanied by mtDNA transfer, is a common, rather than seldom, event also among other species of the genus *Salvelinus* [24, 25, 30, 31, 38, 39, and others]. Moreover, certain regularity is seen in the direction of the mtDNA transfer. As a rule, of two hybridizing char species, the species with the more southern range acts as the recipient of foreign mtDNA [16, 24, 25]. Hence, we believe that the proposed scenario, albeit seemingly complex, is very likely. Judging from the available data (see [38–40] and the references therein), a similar situation is observed in East Pacific, where the mediated mtDNA transfer might have occurred in the series Alpinoid chars → *S. confluentus* Suckley, 1859 → *S. lordii*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank V.V. Bogatov, A.V. Ermolenko, Yu.N. Zhuravlev, E.A. Makarchenko, M.B. Shed'ko (Institute of Biology and Soil Sciences) for assistance in collecting the material and (or) careful organization of the expeditions.

This study was supported by the Russian Foundation for Fundamental Research (grant nos. 03-04-49730, 06-04-96004). The expeditions were supported by the Biological Science Directorate (Biotic Surveys and Inventories program) and International Program Division of the United States National Science Foundation (grant nos. DEB-9400821, DEB-9505031, and DEB-0071655, T.W. Pietsch, Director, as well as by the Japan Society for the Promotion of Science (grant no. BSAR-401, K. Amaoka, Director).

REFERENCES

1. Glubokovsky, M.K., Frolov, S.V., Efremov, V.V., et al., Phylogenetic Relationships and Systematics of Chars in El'gygytgyn Lake, in *Priroda vpadiny ozera El'gygytgyn (problemy izucheniya i okhrany)* (The Nature of the El'gygytgyn Depression: Problems of Investigation and Conservation), Magadan: SVKNII DVO RAN, 1993, pp. 149–177.
2. Sheiko, B.A. and Fedorov, V.V., Class Cephalaspidomorphi (Lampreys). Class Chondrichthyes (Cartilaginous Fishes). Class Holocephali. Class Osteichthyes (Bony Fishes), in *Katalog pozvonochnykh zhyvotnykh Kamchatki i sopredel'nykh morskikh akvatorii* (Catalog of Vertebrates of Kamchatka and Adjacent Waters), Petropavlovsk-Kamchatskii: Kamchatskii Pechatnyi Dvor, 2000, pp. 7–69.
3. Shedko, S.V., The List of Cyclostomes and Fresh Water Fishes of the Primor'e Coast, in *Chteniya pamyati Vladimira Yakovlevicha Levanidova. Vyp. 1* (Vladimir Yakovlevich Levanidov's Memorial Lectures, issue 1), Vladivostok: Dal'nauka, 2001, pp. 229–249.
4. Shedko, S.V., Review of Fresh Water Ichthyofauna, in *Rastitel'nyi i zhyvotnyi mir Kuril'skikh ostrovov (materialy Mezhdunarodnogo Kuril'skogo proekta)* (Flora and Fauna of the Kuril Islands), Proc. Int. Kuril Islands Project, Vladivostok: Dal'nauka, 2002, pp. 118–134.
5. Bogutskaya, N.G. and Naseka, A.M., *Catalog beschelyustnykh i ryb presnykh i solonovatykh vod Rossii s nomenklaturnymi i taksonomicheskimi kommentariyami* (Catalog of Agnathous and Fish of the Fresh and Salty Waters of Russia), Moscow: Tovarishestvo Nauchn. Izd. KMK, 2004.
6. Ginatulina, L.K., Shedko, S.V., Ginatulin, A.A., and Miroshnichenko, I.L., Features of Genetic Differentiation of Dolly Varden Char *Salvelinus malma* (Salmonidae) Inhabiting Rivers of the Far East, *Biodiversity and Dynamics of Ecosystems in North Eurasia*, Novosibirsk: IC and G, 2000, vol. 1, part 3, pp. 40–41.
7. Oleinik, A.G., Skurikhina, L.A., Brykov, V.A., et al., Mitochondrial DNA Divergence in Two subspecies of Dolly Varden Char *Salvelinus malma* (Salmonidae: Pisces), *Dokl. Akad. Nauk*, 2001, vol. 376, no. 6, pp. 844–846.

8. Oleinik, A.G., Skurikhina, L.A., and Brykov, V.I.A., The Divergence of the Dolly Varden Char *Salvelinus malma* in the Asian Northern Pacific Populations Inferred from the RCR-RFLR Analysis of Mitochondrial DNA, *Russ. J. Genet.*, 2002, vol. 38, no. 10, pp. 1181–1188.
9. Brunner, P.C., Douglas, M.S., Osinov, A., et al., Holarctic Phylogeography of Arctic Char (*Salvelinus alpinus* Complex) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences, *Evolution*, 2001, vol. 55, no. 3, pp. 573–586.
10. Palva, T.K. and Palva, E.T., Rapid Isolation of Animal Mitochondrial DNA by Alkaline Extraction, *FEBS Lett.*, 1985, vol. 192, pp. 267–270.
11. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
12. Omelchenko, V.T., Salmenkova, E.A., and Shedko, S.V., Allozyme Diversity and Genetic Divergence of the Dolly Varden *Salvelinus malma* Walbaum from the Kuril Islands, *Russ. J. Genet.*, 2002, vol. 38, no. 9, pp. 1066–1075.
13. Uiblein, F., Jagsch, A., Honsig-Erlenburg, W., and Weiss, S., Status, Habitat Use, and Vulnerability of the European Grayling in Austrian Waters, *J. Fish. Biol.*, 2001, vol. 59, Suppl. A, pp. 223–247.
14. Staden, R., Beal, K.F., and Bonfield, J.K., The Staden Package 1998, *Comput. Meth. Mol. Biol.*, 1999, vol. 132, pp. 115–130.
15. Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M., MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment, *Brief Bioinform.*, 2004, vol. 5, pp. 150–163.
16. Doiron, S., Bernatchez, L., and Blier, P., A Comparative Mitogenomic Analysis of the Potential Adaptive Value of Arctic Char mtDNA Introgression in Brook Char Populations, *Mol. Biol. Evol.*, 2002, vol. 19, pp. 1902–1909.
17. Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., MRBAYES 3: Bayesian Phylogenetic Inference Under Mixed Models, *Bioinformatics*, 2003, vol. 19, pp. 1572–1574.
18. Lewis, P.O., A Likelihood Approach to Estimating Phylogeny from Discrete Morphological Character Data, *Syst. Biol.*, 2001, vol. 50, pp. 913–925.
19. Swofford, D.L., *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Version 4.0b10*, Sunderland: Sinauer, 2002.
20. Adachi, J. and Hasegawa, M., MOLPHY Version 2.3: Programs for Molecular Phylogenetics Based on Maximum Likelihood, *Comput. Sci. Monogr. Inst. Stat. Math.*, 1996, vol. 28.
21. Cassens, I., Mardulyn, P., and Milinkovitch, M.C., Evaluating Intraspecific “Network” Construction Methods Using Simulated Sequence Data: Do Existing Algorithms Outperform the Global Maximum Parsimony Approach?, *Syst. Biol.*, 2005, vol. 54, pp. 363–372.
22. Roff, D.A. and Bentzen, P., The Statistical Analysis of Mitochondrial DNA Polymorphisms: 2 and the Problem of Small Samples, *Mol. Biol. Evol.*, 1989, vol. 6, pp. 539–545.
23. McElroy, D., Moran, P., Bermingham, E., and Kornfield, I., REAP: An Integrated Environment for the Manipulation and Phylogenetic Analysis of Restriction Data, *J. Hered.*, 1992, vol. 83, pp. 157–158.
24. Glemet, H., Blier, P., and Bernatchez, L., Geographic Extent of Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) mtDNA Introgression in Brook Char Populations (*S. fontinalis*) from Eastern Quebec, Canada, *Mol. Ecol.*, 1998, vol. 7, pp. 1655–1662.
25. Wilson, C. and Bernatchez, L., The Ghost of Hybrids Past: Fixation of Arctic Char (*Salvelinus alpinus*) Mitochondrial DNA in Introgressed Population of Lake Trout (*S. namaycush*), *Mol. Ecol.*, 1998, vol. 7, pp. 127–132.
26. Chereshevnev, I.A., Systematics of Migratory Char (Genus *Salvelinus*) from the Ioniveem River Basin (Chukotka Peninsula), in *Sistematika i ekologiya ryb kontinental'nykh vodoemov Dal'nego Vostoka* (Systematics and Ecology of the Fish from the Far East Continental Water Bodies), Vladivostok: DVNTS Akad. Nauk SSSR, 1979, pp. 114–125.
27. Salmenkova, E.A., Omelchenko, V.T., Kolesnikov, A.A., and Malinina, T.V., Genetic Differentiation of Chars in the Russian North and Far East, *J. Fish. Biol.*, 2000, vol. 57, Suppl. A, pp. 136–157.
28. Oleinik, A.G., Skurikhina, L.A., Frolov, S.V., et al., Differences between Two Subspecies of Dolly Varden, *Salvelinus malma*, Revealed by RFLP-PCR Analysis of Mitochondrial DNA, *Environ. Biol. Fish.*, 2004, vol. 69, pp. 449–459.
29. Radchenko, O.A., Genetic Differentiation Inferred from Data on Restriction Analysis of Mitochondrial DNA in the Northern and Southern forms of the Dolly Varden Char, *Russ. J. Genet.*, 2002, vol. 38, no. 4, pp. 421–428.
30. Radchenko, O.A., *Izmenchivost' mitokhondrial'noi DNK gol'tsov roda Salvelinus* (Mitochondrial DNA Variability in Char of the Genus *Salvelinus*), Magadan: SVNTC DVO RAN, 2005.
31. Radchenko, O.A., Variability of Nucleotide Sequences of Mitochondrial DNA Cytochrome b Gene in Chars of the Genus *Salvelinus*, *Russ. J. Genet.*, 2004, vol. 40, no. 3, pp. 244–254.
32. Shedko, S.V., Fresh-Water Fish, in *Ekspeditsiya na NIS “Akademik Oparin”, reis no. 23. Press-reliz* (Expedition on the Research Ship *Akademik Oparin*, Cruise No. 23: Press Release), Vladivostok: Dal'nauka, 1999, pp. 13–16.
33. Savvaitova, K.A., Kuzishchin, K.V., Konchakova, M.A., and Gruzdeva, M.A., Variations in Cranium Structure in the Chars (Genus *Salvelinus*) of Kamchatka–Kuril Ridge and Taxonomic Status of the Forms, *Vopr. Ikhtiol.*, 2004, vol. 44, no. 3, pp. 313–331.
34. Bezverkhii, V.L., Pletnev, S.P., and Nabiulin, A.A., Essay of Geologic Structure and Development of the Kuril Island Arc System and Adjacent Territories, in *Rastitel'nyi i zhivotnyi mir Kuril'skikh ostrovov* (Flora and Fauna of the Kuril Islands), Proc. Int. Kuril Islands Project, Vladivostok: Dal'nauka, 2002, pp. 9–22.
35. Crane, P.A., Seeb, L.W., and Seeb, J.E., Genetic Relationships among *Salvelinus* Species Inferred from Alloz-

- yme Data, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1994, vol. 51, Suppl. 1, pp. 182–197.
36. Osinov, A.G. and Pavlov, S.D., Allozyme Variability and Genetic Divergence in Populations of Arctic Char and Dolly Varden (*Salvelinus alpinus*–*S. malma* Complex), *Vopr. Ikhtiol.*, 1998, vol. 38, no. 1, pp. 47–61.
 37. Osinov, A.G., Evolution Relationships between the Major Taxa of the *Salvelinus alpinus*–*S. malma* Complex: Results of Comparative Analysis of Allozyme Data Obtained of Different Authors, *Vopr. Ikhtiol.*, 2001, vol. 41, no. 2, pp. 167–183.
 38. Phillips, R.B., Sajdak, S.L., and Domanico, M.J., Relationships Among Chars Based on DNA Sequences, *Nordic J. Freshwater Res.*, 1995, vol. 71, pp. 378–391.
 39. Redenbach, Z. and Taylor, E.B., Evidence for Bimodal Hybrid Zones between Two Species of Char (Pisces: *Salvelinus*) in Northwestern North America, *J. Evol. Biol.*, 2003, vol. 16, pp. 1135–1148.
 40. Grewe, P.M., Billington, N., and Hebert, P.D.N., Phylogenetic Relationships Among Members of *Salvelinus* Inferred from Mitochondrial DNA Divergence, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1990, vol. 47, no. 5, pp. 984–991.

УДК 575.86+575.13:597.553.2(571.6)

ФИЛОГЕОГРАФИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ЮЖНОЙ АЗИАТСКОЙ МАЛЬМЫ *Salvelinus curilus* (Pallas, 1814) (*Salmoniformes*, *Salmonidae*): ОПОСРЕДОВАННАЯ ИНТРОГРЕССИЯ ГЕНОВ?

© 2007 г. С. В. Шедько, Л. К. Гинатулина, И. Л. Мирошниченко, Г. А. Немкова

Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Владивосток 690022; факс: (4232) 31-01-93; e-mail: shedko@ibss.dvo.ru

Поступила в редакцию 19.04.2006 г.

Проанализированы нуклеотидные последовательности фрагментов гена тРНК-Pro (27 пн) и контрольной области (483–484 пн) мтДНК у 41 экз. южной азиатской мальмы *Salvelinus curilus*, собранных из 20 локальностей, покрывающих практически весь ареал данного вида – Курильские острова, о-в Сахалин и Приморье. Кроме того, исследованы 6 экз. трех других, близких к первому, видов гольцов, обитающих на Дальнем Востоке, – *S. albus*, *S. malma* и *S. leucomaenis*. Всего выявлено 12 различных вариантов мтДНК-гаплотипов, сформировавших три хорошо выраженные группы, различающиеся по 14–20 нуклеотидным позициям. Одну группу составили шесть гаплотипов, обнаруженных у *S. curilus* на Курильских островах, Сахалине и Приморье (мтДНК-филогруппа ОКНОТСКИА). Вторую группу сложили четыре гаплотипа, представляющих ранее выделенную (Brunner et al., 2001) мтДНК-филогруппу BERING и найденных у *S. curilus* на Курильских островах и Сахалине, а также у *S. albus* и *S. malma* на Камчатке и северных Курилах; третью – два гаплотипа, обнаруженных у *S. leucomaenis*. Наличие двух линий мтДНК (ОКНОТСКИА и BERING) у *S. curilus* с Курил и Сахалина объяснено гибридизацией и переносом мтДНК от *S. malma* к *S. curilus*. Отсутствие гаплотипов BERING у *S. curilus* из водоемов Приморья связано с физической изоляцией бассейнов Охотского и Японского морей в прошлые эпохи. На основании сопоставления филогенетических деревьев, построенных по данным анализа изменчивости аллозимов и мтДНК, высказано предположение о том, что в рассмотренном случае могла произойти опосредованная передача мтДНК в цепи: альпиноидные гольцы → *S. malma* → *S. curilus*.

Южная азиатская мальма *Salvelinus curilus* (Pallas, 1814) была описана П.С. Палласом по нескольким экземплярам гольцов из рек Курильских островов под именем *Salmo curilus*. С недавних пор ее рассматривают в ранге самостоятельного вида и младшими синонимами этого названия являются: *Salmo laevigatus* Pallas, 1814; *Salmo fariopsis* Kner, 1870; *Salvelinus malma krascheninnikovi* Taranetz, 1933 (см. [1–5]). Как и большинство других видов гольцов рода *Salvelinus*, южная азиатская мальма проявляет высокую степень морфологической изменчивости и имеет как проходной, так и чисто пресноводный (жилой) экотипы, соотношение которых в популяциях варьирует в зависимости от их географического положения и других абиотических характеристик. Ареал *S. curilus* охватывает Шантарские и Курильские острова, о-в Сахалин, о-в Хоккайдо, материковое побережье от лимана Амура до рек Северной Кореи, а также некоторые водотоки бассейна р. Усури, оз. Ханка и р. Ялу. Южная азиатская мальма входит в состав морфологически сходной мальмоидной группы видов гольцов рода *Salvelinus*, включающей кроме *S. curilus* также типичную мальму *S. malma* (Walbaum, 1792), южную американскую

мальму *S. lordii* (Gunther, 1866), белого гольца *S. albus* Glubokovsky, 1977, длинноголового гольца *S. kronocius* Viktorovsky, 1978 и другие родственные мальме виды гольцов (см. [1]). Мальмоидные гольцы широко распространены в Северной Пацифике, где они доминируют над немногочисленными здесь представителями альпиноидной группы гольцов *Salvelinus*, таксономически и экологически наиболее разнообразной в водоемах бассейна Северного Ледовитого океана и включающей арктического гольца *S. alpinus* (L.), гольца Таранца *S. taranetzi* Kaganowsky, 1955, *S. oquassa* (Girard, 1854) и другие виды, близкие к *S. alpinus*.

Ранее при анализе выборок южной азиатской мальмы из рек Приморья, Сахалина, Курильских островов, а также мальмы Камчатки были выявлены две хорошо обособленные линии митохондриальной ДНК (мтДНК) [6]. Только одна из этих линий (“приморские” варианты) была обнаружена в выборках *S. curilus* из Приморья. Другая линия мтДНК (“камчатские” варианты) была найдена у мальмы *S. malma* и белого гольца *S. albus* из бассейна р. Камчатка (п-ов Камчатка). Обе линии присутствовали в некоторых выборках *S. curilus* из рек юга Сахалина и южных Курил. Другие ав-

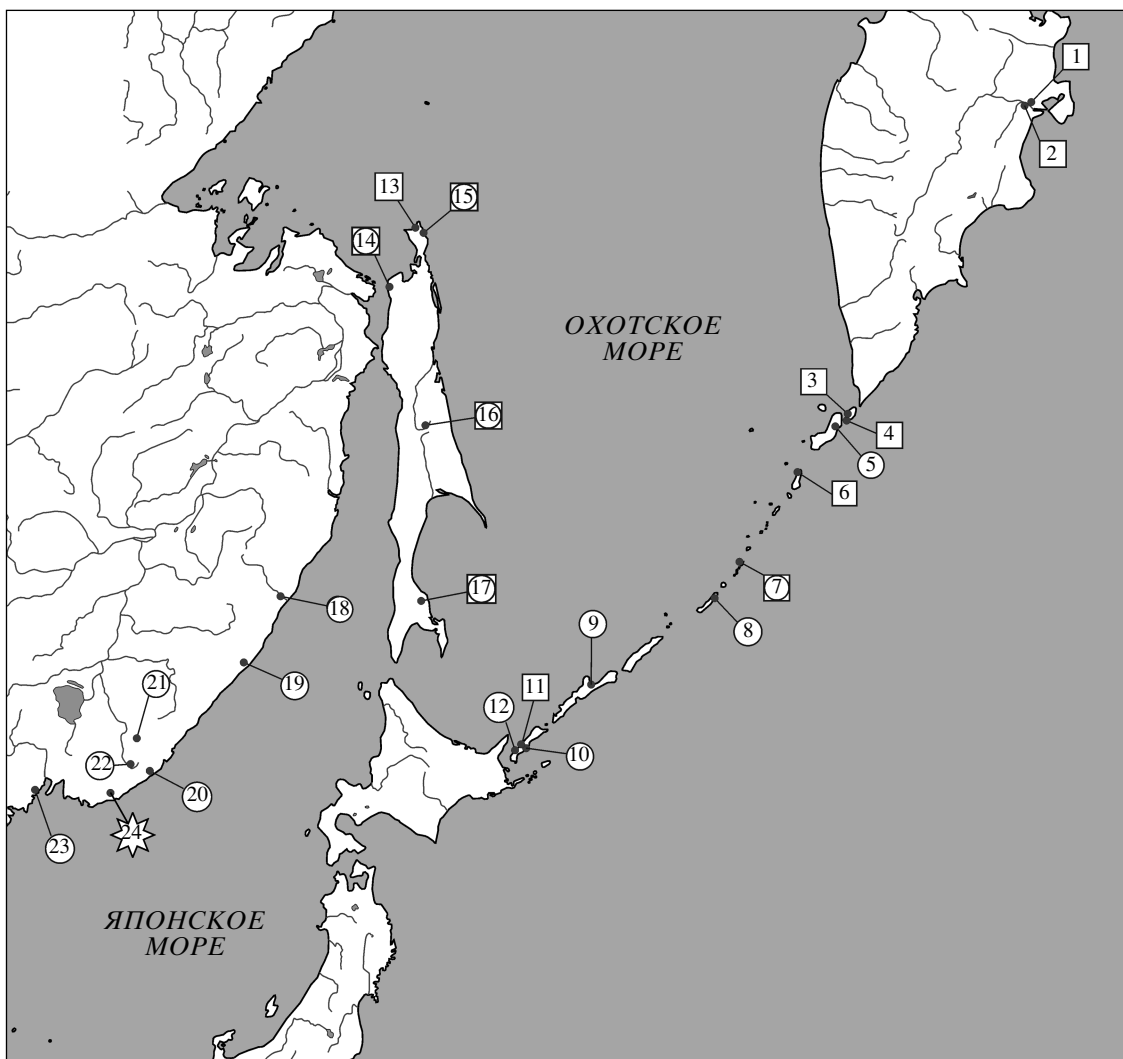


Рис. 1. Карта-схема мест взятия материала (1–24 – см. табл. 1; обозначения значков-маркеров выборок расшифрованы в тексте).

торы, пересмотрев первоначальную интерпретацию своих материалов [7], также указали на наличие двух линий мтДНК в некоторых выборках южной азиатской мальмы из рек Сахалина [8].

Основная цель настоящей работы состояла в идентификации и установлении положения обнаруженных вариантов мтДНК южной азиатской мальмы в общей структуре разнообразия мтДНК альпиноидных и мальмоидных гольцов *Salvelinus* (см.: [9]) на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента контрольной области митохондриального генома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала использована часть коллекции препаратов митохондриальной или тотальной ДНК, полученных в разное время щелочным [10] или стандартным фенол-хлоро-

формным [11] методами из тканей свежей или фиксированной спиртом печени, взятых от четырех видов гольцов из различных районов Дальнего Востока России (рис. 1, табл. 1).

Фрагмент митохондриального генома гольцов, целиком включающий его контрольную область, был амплифицирован методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием прямого LRBT-25 (5'-AGA-GCG-CCG-GTG-TTG-TAA-TC-3') и обратного LRBT-1195 (5'-GCT-AGC-GGG-ACT-TTC-TAG-GGT-C-3') праймеров [13], специфичных к фланкирующим его генам транспортной РНК (тРНК-Thr и тРНК-Phe). Амплификацию проводили на приборе UNO-Thermoblock ("Biometra", Германия) в 50 мкл реакционной смеси, включавшей 10–20 нг мтДНК (или 1–2 мкг тотальной ДНК), 5 мкл буфера (0.6 М трис-НСl, рН 8.5; 0.015 М MgCl₂; 0.25 М KCl; 0.1 М 2-меркаптоэтанол; 1%-ный тритон-X-100), 5 мкл суммы

Таблица 1. Нумерация выборок, географическая характеристика и объем (*n*) изученного материала

№	Вид гольцов, место и дата сбора материала	<i>n</i>
	<i>S. albus</i> Glubokovsky, 1977 – белый голец	
1	Р. Радуга, бас. р. Камчатка, п-ов Камчатка (18.09.1998)	3
	<i>S. malma</i> (Walbaum, 1792) – мальма	
2	Кл. Дьяконовский, впадающий в протоку Азабачья, бас. р. Камчатка, п-ов Камчатка (19.09.1998)	1
3*	Протока оз. Большое, о-в Шумшу, Курильские острова (31.07.1999)	2
	<i>S. curilus</i> (Pallas, 1814) – южная азиатская мальма	
4	Безымянный ключ у д. Байково, о-в Шумшу, Курильские острова (29.07.1999)	2
5	Безымянный ключ в бух. Рифовая, о-в Парамушир, Курильские острова (30.07.1999)	2
6*	Безымянный ключ в бух. Немо, о-в Онекотан, Курильские острова (24.07.1999)	1
7*	Безымянный ключ, впадающий в южную часть оз. Тихое, о-в Расшуа, Курильские острова (04.08.1999)	2
8*	Безымянный ключ в бух. Душная, о-в Симушир, Курильские острова (09.08.1999)	2
9*	Р. Пионер, зал. Куйбышевский, о-в Итуруп, Курильские острова (13.08.1999)	1
10	Безымянный ключ у д. Отрадное, о-в Кунашир, Курильские острова (16.08.1999)	1
11	Безымянный ключ у м. Столбчатый, о-в Кунашир, Курильские острова (17.08.1999)	1
12	Р. Алехина в бух. Алехина, о-в Кунашир, Курильские острова (18.08.1999)	1
13	Р. Той, зал. Северный, п-ов Шмидта, о-в Сахалин (05.08.2001)	1
14	Р. Тумь, п-ов Шмидта, о-в Сахалин (09.08.2001)	2
15	Р. Талики, п-ов Шмидта, о-в Сахалин (14.08.2001)	2
16	Р. Тымь (верховья), о-в Сахалин (02.08.2002)	3
17	Р. Белая, бас. р. Найба, о-в Сахалин (10.09.1999; 14.07.2002)	3
18	Р. Самарга, Приморский край (11.06.1992)	2
19	Р. Максимовка, Приморский край (05.10.1998)	2
20	Р. Милоградовка, Приморский край (04.07.1996)	2
21	Р. Извилинка, бас. р. Уссури, Приморский край (29.10.1996)	1
22	Р. Уссури (верховья), Приморский край (20.10.1995)	2
23	Р. Рязановка в зал. Петра Великого, Приморский край (05.07.2000)	4
	<i>S. leucomaenis</i> (Pallas, 1814) – кунджа	
10	Безымянный ключ у д. Отрадное, о-в Кунашир, Курильские острова (16.08.1999)	1
17	Р. Белая, бас. р. Найба, о-в Сахалин (14.07.2002)	1
18	Р. Самарга, Приморский край (11.06.1992)	1
24	Р. Кривая, бас. р. Киевка, Приморский край (10.10.1993)	1

* Ранее эти выборки были исследованы методом аллозимного анализа [12].

дезокситрифосфатов из 8 мМ раствора, по 5 мкл обоих праймеров из 2мкМ растворов, 2–2.5 е.а. *Taq*-полимеразы (“СибЭнзим”, г. Новосибирск) и деионизированную воду. ПЦР-реакцию проводили по следующей схеме: начальная денатурация (96°C – 60 с), 30 циклов амплификации (96°C – 90 с, 56°C – 60 с, 72°C – 90 с) и достройка цепей (72°C – 300 с).

Продукты амплификации очищали на колонках Quantum Prep (“Bio-Rad Laboratories”, США) и подвергали циклическому секвенированию с помощью набора Big Dye Terminator версии 3.1 (“Applied Biosystems”, США) с использованием прямого праймера (LRBT-25) в одной реакции, а также

дополнительного обратного внутреннего праймера (5'-ATA-TAA-GAG-AAC-GCC-CGG-CT-3') в другой при следующих условиях: начальная денатурация (96°C – 300 с) и 30 циклов амплификации (96°C – 30 с, 55°C – 10 с, 60°C – 240 с). Последовательности нуклеотидов определяли на автоматическом секвенаторе ABI Prizm 310 (“Applied Biosystems”, США) на базе Биолого-почвенного института ДВО РАН (г. Владивосток). АВХроматограммы анализировали и при необходимости редактировали с помощью программ из пакета Staden 1.53 [14]. Различные манипуляции по подготовке последовательностей к последующе-

Таблица 2. Распределение выявленных гаплотипов по 24 выборкам гольцов

Номер выборки	Гаплотипы											
	LEU1	LEU2	BER20	BER21	BER22	BER23	ОКН1	ОКН2	ОКН3	ОКН4	ОКН5	ОКН6
П-ов Камчатка												
1				1*		2*						
2				1								
Курильские острова												
3				2*								
4				1		1						
5									1*		1*	
6				1								
7				1						1		
8									1*		1*	
9									1			
10	1*								1			
11				1								
12								1				
О-в Сахалин												
13				1								
14			1*					1				
15				1					1*			
16				1				1	1			
17	1*				1						1	1
Приморский край												
18		1*						2*				
19								1*			1*	
20								2				
21								1				
22								2				
23							2	2				
24		1*										

Примечание. Звездочками помечены гаплотипы, найденные у проходных гольцов.

ных выборках оценок правдоподобия (RELL-метод, программа NucML из пакета Molphy; [20]).

Эвристический поиск наиболее экономных деревьев (MP-деревьев) проведен также с помощью программы RAUP по невзвешенной матрице данных (61 филогенетически информативный признак, включая инсерции/делеции) в 100 повторностях со случайным характером включения последовательностей в анализ и с перестановками по TBR-алгоритму и ограничением максимально возможного числа деревьев до 10000. Устойчивость полученного порядка кластеризации была оценена методом бутстрэпа в 1000 псевдослучайных репликах (программа RAUP).

Визуализацию возможных вариантов мутационных переходов между близкородственными

мтДНК-гаплотипами осуществляли путем объединения MP-деревьев в филогенетические сети (UMP; [21]).

Проверку однородности выборок по частотам мтДНК-гаплотипов выполняли с помощью модифицированного критерия χ^2 [22], в котором вероятность принятия нулевой гипотезы оценивалась по результатам 10000 псевдослучайных перестановок (программа MONTE из пакета REAP; [23]).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Секвенирование фрагментов гена тРНК-Pro (27 пн) и контрольной области мтДНК (483–484 пн) у 47 экз. четырех видов гольцов выявило 12 различных вариантов мтДНК-гаплотипов (табл. 2;

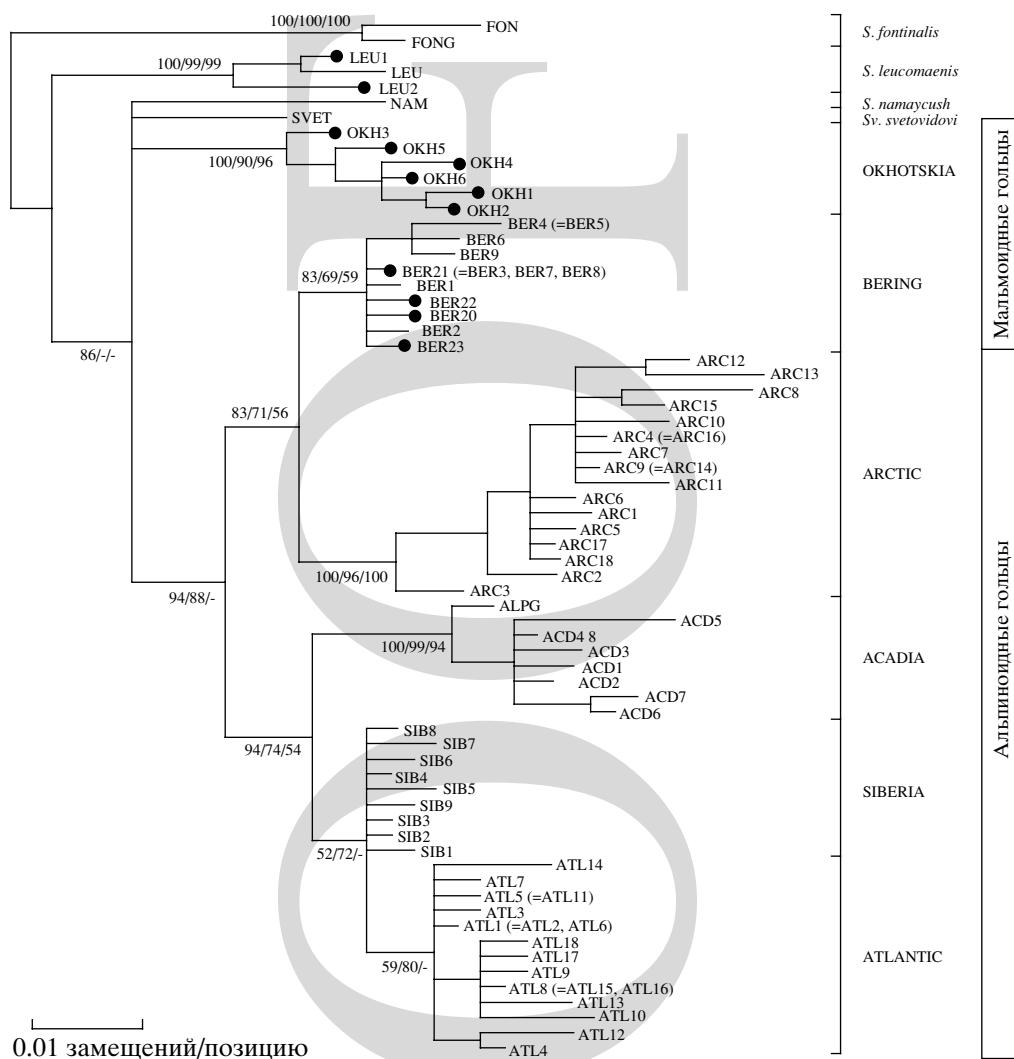


Рис. 3. Байесовское дерево (50%-ный консенсус 47000 деревьев) гаплотипов гольцов, полученное на основе анализа фрагмента контрольной области мтДНК, длиной 481 пн. Устойчивость основных клад альпийных и мальмоидных гольцов и их филогенетических взаимоотношений отражена в оценках байесовских апостериорных вероятностей (первая цифра), а также в локальных бутстрэповых индексах ML-дерева (вторая) и стандартных бутстрэповых индексах, полученных для MP-дерева (третья), воспроизведших по существу такую же топологию. Проверк означает воспроизводимость данного узла ветвления менее половины всех реплик бутстрэпа. Жирными точками выделены гаплотипы, выявленные в настоящем исследовании.

рис. 2, 3). По два гаплотипа обнаружены у кунджи *S. leucomaenis* (LEU1 и LEU2) и у белого гольца *S. albus* (BER21 и BER23). У мальмы *S. malma* найден один (BER21), а у южной азиатской мальмы *S. curilus* – десять гаплотипов (BER20–23, ОКН1–6). Эти 12 гаплотипов разделились на три хорошо выраженные группы, различающиеся между собой по 14–20 нуклеотидным позициям: 1) LEU1 и LEU2; 2) BER20–23; 3) ОКН1–6. Внутри каждой из этих групп уровень отличий значительно ниже – от 1 до 6 нуклеотидных позиций (рис. 2). Сравнение вариантов секвенированных нами последовательностей с последовательностями мтДНК гольцов из генетической базы данных Genbank/NCBI по перекрывающемуся участку (позиции с 5-й по

485-ю контрольной области мтДНК, всего – 481 пн) показало, что гаплотипы из первой группы характерны для *S. leucomaenis* (см. рис. 2, 3; табл. 3). Гаплотипы из второй группировки являются представителями ранее выделенной Бруннером и соавт. [9] мтДНК-филогруппы BERING, найденной ими преимущественно у *S. malma*. При этом гаплотип BER21 по данному участку мтДНК ничем не отличался от гаплотипов BER3, BER7 и BER8 из указанной работы. Гаплотипы же из третьей группировки (ОКН1–6) Бруннером и соавт. [9] найдены не были и составили новую мтДНК-филогруппу, для обозначения которой мы вводим название ОКHOTSKIA.

Таблица 3. Среднее число нуклеотидных различий (дистанция K2P, ×100) между видами и/или мтДНК-филогруппами альпиноидных и мальмоидных гольцов

№	Вид/филогруппа	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<i>S. fontinalis</i>	1.05									
2	<i>S. leucomaenis</i>	5.70	1.27								
3	<i>S. namaycush</i>	5.79	3.36	–							
4	<i>Sv. svetovidovi</i>	5.32	3.66	3.43	–						
5	OKHOTSKIA	5.48	3.71	3.80	2.74	0.57					
6	ACADIA	6.61	5.04	5.03	3.74	3.19	1.06				
7	SIBERIA	6.04	3.47	3.51	2.56	2.58	2.24	0.70			
8	ATLANTIC	6.55	3.84	3.87	3.12	2.38	2.33	1.40	0.80		
9	ARCTIC	6.47	4.51	5.09	3.04	4.52	4.46	3.59	4.24	1.09	
10	BERING	5.15	3.29	4.08	2.75	2.76	2.36	2.05	2.20	2.61	0.54

Согласно проведенным расчетам дистанций (табл. 3), среди шести группировок альпиноидных и мальмоидных гольцов мтДНК-филогруппы ATLANTIC и SIBERIA демонстрируют наибольшее сходство друг с другом. OKHOTSKIA и ACADIA, хорошо различаясь между собой, удалены от первой пары примерно в одной и той же степени. Наиболее обособлена от всех филогруппа ARCTIC. Филогруппа же BERING, а также гаплотип SVET (*Sv. svetovidovi*) равноудалены от вышеперечисленных пяти мтДНК-филогрупп.

На филогенетическом дереве, полученном в рамках байесовского подхода (LnL = -2012.80), мтДНК-филогруппа BERING составила одну кладу с мтДНК-филогруппой ARCTIC, а другую кладу сложили мтДНК-филогруппы ATLANTIC, SIBERIA и ACADIA (рис. 3). По отношению к обоим объединениям группа гаплотипов OKHOTSKIA, а также гаплотип SVET заняли базальное положение.

В результате эвристического поиска на основе критерия максимального правдоподобия с использованием модели K2P было найдено 13 одинаково правдоподобных деревьев (LnL = -1908.76, отношение скорости транзиций к скорости трансверсий – 4.88), имевших практически ту же самую топологию, что и дерево, представленное на рис. 3, и поэтому они здесь не приводятся. Между собой эти 13 ML-деревьев различались лишь минорными перестановками внутри группировок BERING и ATLANTIC.

Топология дерева, представлявшего строгий консенсус 10000 одинаково экономных MP-деревьев (длина – 148 шагов; индекс соответствия CI – 0.51; индекс гомоплазии HI – 0.49; индекс удерживания RI – 0.87), принципиально ничем не отличалась от байесовского дерева на рис. 3 и поэтому также не приведена.

Таким образом, все три использованных подхода (байесовский, максимального правдоподобия

и экономии) в конечном итоге привели к одному и тому же варианту мтДНК-филогении альпиноидных и мальмоидных гольцов. При этом клады мтДНК-филогрупп OKHOTSKIA, ARCTIC и ACADIA характеризовались высоким уровнем поддержки (см. рис. 3). Дискретность же мтДНК-филогрупп ATLANTIC и (особенно) SIBERIA не столь очевидна. Воспроизводимость клады BERING оказалась равной или несколько меньшей уровня поддержки остальных узлов ветвления дерева на рис. 3 в той его части, которая отражает порядок объединения всех перечисленных мтДНК-филогрупп.

Филогенетические сети, построенные для мтДНК-филогрупп OKHOTSKIA и BERING (рис. 4), демонстрируют специфический характер нуклеотидных замещений в изученном фрагменте контрольной области мтДНК гольцов. Любое из пяти максимально экономных деревьев, полученных для группировки OKHOTSKIA, включает в себя повторные и обратные замены в одних и тех же нуклеотидных позициях. Филогенетическая сеть гаплотипов группировки BERING, суммирующая 181 MP-дерево, также допускает множественные гомопластические нуклеотидные замещения.

Центральное положение в филогенетической сети группировки OKHOTSKIA занимают гаплотипы ОКН2 и ОКН6 (имеют по три соединительных ребра). Гаплотип ОКН2 широко распространен (Приморье, Сахалин и юг Курильских островов) и доминирует по частоте встречаемости у южной азиатской мальмы из Приморья. Второй гаплотип найден лишь единожды – на юге о-ва Сахалин. Из четырех оставшихся гаплотипов два – редкие и найдены в небольшом числе только на юге Приморья (ОКН1) или средних Курилах (ОКН4), а другие два имеют сравнительно широкое распространение от северного Приморья до северных Курил (ОКН3 и ОКН5).

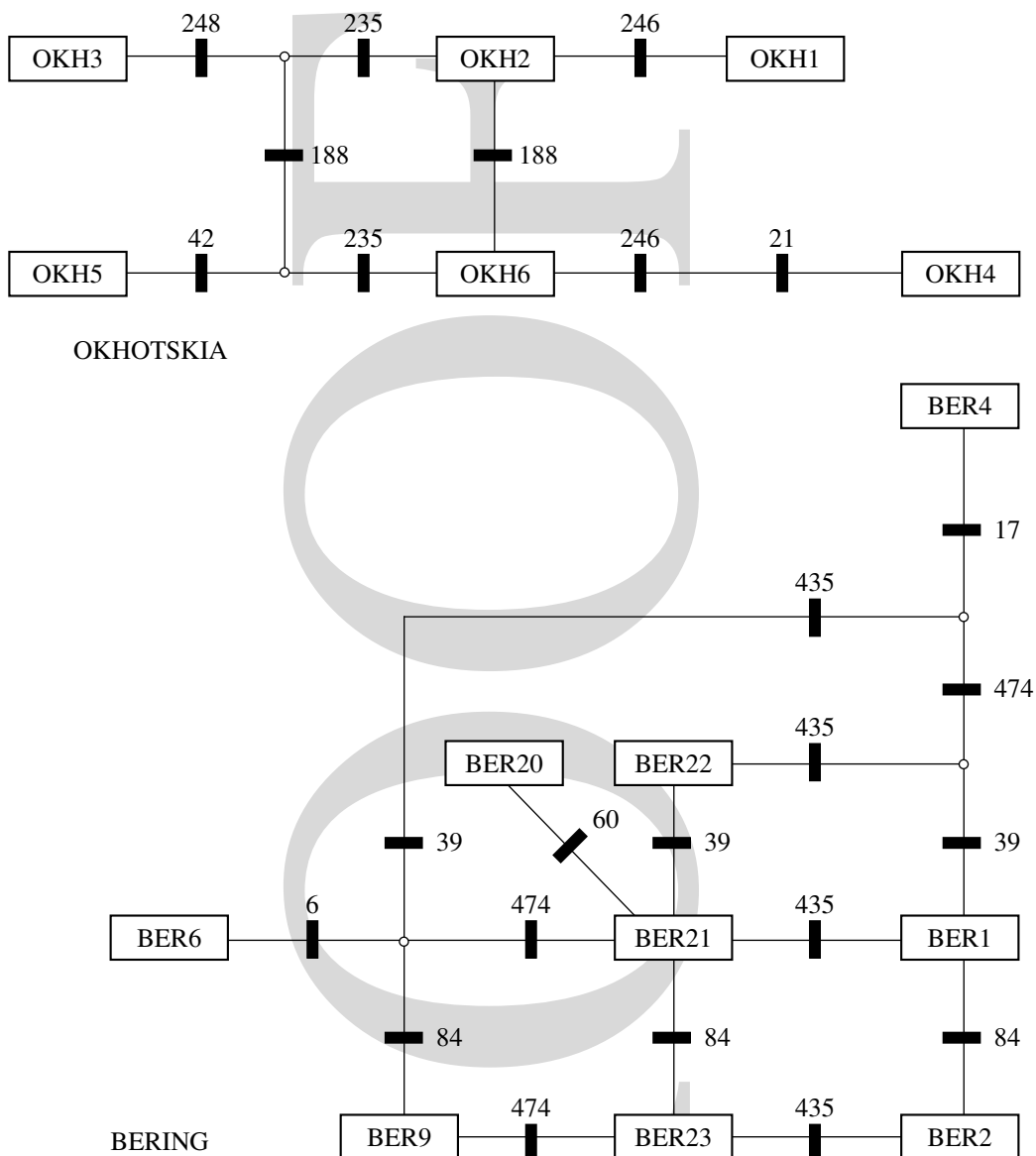


Рис. 4. Филогенетические сети гаплотипов мтДНК-филогрупп OKHOTSKIA и BERING, полученные методом объединения наиболее экономных деревьев (UMP [21]). Цифры – позиции нуклеотидных замен в контрольной области мтДНК гольцов (см. рис. 2).

В центре филогенетической сети мтДНК-филогруппы BERING также располагается гаплотип, который наиболее часто, в сравнении с другими гаплотипами из этой группировки, представлен в выборках южной азиатской мальмы – BER21 (пять соединительных ребер). Кроме южной азиатской мальмы, этот гаплотип найден нами у мальмы и белого гольца на Камчатке и, кроме того, судя по литературным данным [9], тот же вариант имеется у мальмы на Чукотке и южной американской мальмы *S. lordii* на Аляске (гаплотип BER21 по рассмотренному участку неотличим от гаплотипов BER3, BER7 и BER8 из указанной работы). Гаплотип BER23, характеризующийся в филогенетической сети тремя соединительными

ребрами, найден у белого гольца на Камчатке и у южной азиатской мальмы с северных Курил.

Несколько гаплотипов, ранее найденных Бруннером и соавт. [9] у белого гольца (BER1) и мальмы (BER2) на Камчатке, у мальмы на Аляске (BER6 и BER9), у (южной?) мальмы с о-ва Парамушир (BER4–5), в наших сборах не обнаружены. Все они, за исключением первого из перечисленных, в филогенетической сети мтДНК-филогруппы BERING занимают периферическое положение. К периферическим можно отнести и два редких гаплотипа, найденных нами у единичных особей южной азиатской мальмы с севера (BER20) и юга (BER22) о-ва Сахалин.

В целом, по частотам встречаемости мтДНК-гаплотипов наблюдаются отчетливые межрегиональные отличия между выборками южной азиатской мальмы из Приморья, с одной стороны, и с Сахалина и Курил, с другой (табл. 2). В выборках южной азиатской мальмы с Сахалина и Курил представлены обе мтДНК-филогруппы (BERING и OKHOTSKIA)*, и по частотам мтДНК-гаплотипов в объединенных выборках эти два региона однородны – $\chi^2 = 6.35$, $d.f. = 8$, $P = 0.86$. В Приморье гаплотипы из мтДНК-филогруппы BERING не найдены, а по частотам гаплотипов из мтДНК-филогруппы OKHOTSKIA объединенная выборка южной азиатской мальмы из Приморья и объединенная выборка с Сахалина и Курил гетерогенны – $\chi^2 = 14.75$, $d.f. = 5$, $P = 0.001$.

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день по результатам анализа последовательностей левого участка контрольной области митохондриального генома альпиноидных и мальмоидных гольцов рода *Salvelinus* выявлено несколько эволюционных линий мтДНК, имеющих более или менее четкую географическую привязанность и с тем или иным успехом маркирующих различные виды и формы гольцов или их группировки ([9], настоящее сообщение).

Гаплотипы мтДНК-филогрупп ATLANTIC и SIBERIA широко распространены в западном секторе Арктики от п-ва Лабрадор до водоемов Восточной Сибири, относящихся к бассейну р. Лена, и найдены у арктического гольца *S. alpinus* и у других видов и форм альпиноидных гольцов, обитающих на указанной территории.

Сравнительно компактная группа гаплотипов ACADIA распространена в канадских провинциях Квебек и Нью-Брансуик, где обнаружена в основном у *S. oquassa*. В этом регионе, кроме *S. oquassa*, гаплотипы данной мтДНК-линии зафиксированы также в двух популяциях *S. fontinalis* (Mitchill, 1814) и *S. namaycush* (Walbaum, 1792), в которых они полностью замещают свойственные этим видам варианты мтДНК [24, 25]. Гаплотип, обозначенный в настоящей работе как ALPG, как раз представляет вариант митохондриального генома *S. oquassa*, оказавшегося у *S. fontinalis* в результате произошедшей их гибридизации (см.: [16]).

* Здесь необходимо отметить, что из выборок, в которых присутствовали гаплотипы обеих мтДНК-филогрупп, препараты для секвенирования подобраны исходя из результатов их предварительного генотипирования при использовании ПДРФ-анализа полного митохондриального генома или его фрагмента, кодирующего субъединицы 5 и 6 NADH-дегидрогеназы.[0] Поэтому частоты двух мтДНК-филогрупп в таких выборках (см. табл. 2) не отражают их действительно выявленные соотношения (эти данные будут опубликованы в другом месте).

Гаплотипы мтДНК-филогруппы ARCTIC распространены в восточном секторе Арктики от Чукотки до п-ова Лабрадор и найдены в основном у альпиноидных гольцов из этого региона – гольца Таранца *S. taranetzi*, близкой к нему (если не тождественной, см.: [26]) “восточной формы” *S. alpinus*, *S. elgyticus* Viktorovsky et Glubokovsky, 1981 и *S. boganidae* Berg, 1926. Как исключение можно рассматривать единичную находку гаплотипа ARC17 у *S. malma* из оз. Гэлбрейт, расположенного в зоне перекрытия ареалов альпиноидных и мальмоидных гольцов на Аляске.

Гаплотипы мтДНК-филогруппы BERING найдены на Чукотке (у *S. malma*), Аляске (у *S. malma* и *S. lordii*), Камчатке (у *S. malma* и *S. albus*), Курильских островах (у *S. malma* и *S. curilus*) и Сахалине (у *S. curilus*). Исходя из того что результаты настоящей работы и исследования Бруннера с соавт. [9] могут быть сопоставлены с результатами работ по ПДРФ-анализу мтДНК [27–28], поскольку часть проанализированных образцов гольцов собрана из одних и тех же мест (р. Белая у биостанции “Сокол”, о-в Сахалин; р. Камчатка у биостанции “Радуга”, п-ов Камчатка), можно утверждать, что гаплотипы линии BERING распространены также в северной части побережья Охотского моря (у *S. malma*).

Распространение гаплотипов OKHOTSKIA (“приморские” варианты или “южные” гаплотипы в работах [6, 8, 28]) почти в точности повторяет ареал *S. curilus* – Курилы, Сахалин и Приморье, включая изолированные от основного ареала ее популяции из верховьев р. Усури (см. рис. 1, где кружками обозначены выборки с гаплотипами из группы OKHOTSKIA, а квадратами – с гаплотипами из группы BERING). За пределами ареала южной азиатской мальмы гаплотипы OKHOTSKIA пока найдены лишь в нескольких выборках *S. malma* из рек северной части побережья Охотского моря, в которых их частота не превышает 10% (рассчитано по данным работ [27–30]). Имеется также информация о том, что свойственный *S. curilus* вариант мтДНК, выявленный на основе секвенирования фрагмента гена цитохрома b, найден у одной особи *S. malma* из ручья Вилучинский на юго-востоке Камчатки [30–31]. Но эта находка не согласуется с ранее опубликованными результатами ПДРФ-анализа мтДНК данной выборки мальмы [29] и требует проверки.

Среди перечисленных мтДНК-филогрупп BERING и OKHOTSKIA имеют наиболее обширную область географического перекрытия. Поскольку их распространение в основных чертах совпадает с ареалами соответственно *S. malma* и *S. curilus*, можно полагать, что само формирование мтДНК-филогрупп BERING и OKHOTSKIA связано с обособлением и последующей эволюцией указанных видов гольцов. Смешанный состав

митохондриального генофонда *S. curilus* скорее всего является результатом гибридизации этого вида с *S. malma*, приведшей к переносу мтДНК от *S. malma* к *S. curilus* [3, 4, 8]. В связи с этим отметим, что характерная S-образная клина по числу позвонков и другим счетным диагностическим признакам, наблюдающаяся в зоне контакта ареалов *S. curilus* и *S. malma* на северных Курилах [4, 32], может рассматриваться как косвенное свидетельство того, что гибридизация между ними идет в настоящее время или происходила в прошлом. Вероятно, именно этот фактор и привел к некоторому размытию их морфологической дискретности здесь. О наличии на северных Курилах переходных от *S. curilus* к *S. malma* популяций свидетельствуют другие морфологические данные [33], а также результаты анализа аллозимной изменчивости [12]. В целом складывается впечатление, что район северных Курил является зоной гибридизации этих видов гольцов.

Почему же область перекрытия географического распространения гаплотипов OKHOTSKIA и BERING оказалась не ограничена районами контакта ареалов *S. curilus* и *S. malma* (северные Курилы, побережье Охотского моря к северу от устья р. Уда), а протянулась более чем на 1000 км вдоль Курильского архипелага и о-ва Сахалин?

Это может быть вызвано непостоянством географического расположения зоны их гибридизации во времени. Вероятно, в прошлом ареалы *S. curilus* и *S. malma*, как и многих других видов рыб, менялись в соответствии с изменениями климата. В периоды плейстоценовых похолоданий ареалы этих гольцов расширялись или смещались на юг, а в периоды потеплений – на север. Тогда область распространения гаплотипов BERING внутри ареала *S. curilus* может отражать диапазон движения зоны гибридизации в южном направлении. То есть мы полагаем, что в периоды максимальных похолоданий эта зона могла располагаться в южной части Сахалина и Курильского архипелага. Вероятно, что именно изоляция бассейнов Охотского и Японского морей во время регрессий уровня моря, имевших место в периоды похолоданий (см. конфигурацию береговых линий этого района в [34]), препятствовала проникновению гаплотипов группы BERING в митохондриальный генофонд *S. curilus* из водоемов Приморья (все 164 экз. южной азиатской мальмы из различных рек Приморья, протестированных нами методом ПДРФ-анализа мтДНК, несли гаплотипы линии OKHOTSKIA – [6], наши неопубликованные данные). Аналогичным образом можно объяснить и различия приморских и сахалино-курильских выборок *S. curilus* по составу гаплотипов мтДНК-филогруппы OKHOTSKIA.

Поскольку единичные особи *S. malma* изредка фиксировались в реках северо-восточного побе-

режья Хоккайдо, далеко за пределами южной границы ареала мальмы (см. ссылки в [3]), гибридизация с такими особями-мигрантами – еще один фактор, который мог внести некоторый вклад в расширение области географического перекрытия этих мтДНК-филогрупп [3, 4, 8].

Рассматривая складывающуюся картину филогенетических взаимоотношений мтДНК-филогрупп гольцов, нельзя обойти вниманием следующее обстоятельство. На филогенетических деревьях, построенных по аллозимным данным, альпиноидные гольцы составляют монофилетическую группировку по отношению к мальмоидным гольцам [27, 35–37]. Однако во всех вариантах филогенетических деревьев, полученных на основе секвенирования участков митохондриального генома ([9, 30, 31, 38], см. также рис. 3), альпиноидные гольцы оказываются парафилетической группировкой, поскольку свойственные *S. malma* варианты мтДНК неизменно располагаются внутри клады гаплотипов альпиноидных гольцов. Характерные для южной азиатской мальмы варианты мтДНК при этом занимают базальное филогенетическое положение относительно остальных групп гаплотипов, найденных у мальмоидных и альпиноидных гольцов ([30, 31], настоящее сообщение).

Данный факт наводит на мысль о том, что нативная для *S. malma* мтДНК могла быть полностью или частично замещена чужеродной мтДНК, полученной этим видом или его предковой формой от альпиноидных гольцов в результате одного или нескольких эпизодов гибридизации. Таким образом, на наш взгляд, представляется вероятным сценарий опосредованной интрогрессии мтДНК в митохондриальный генофонд *S. curilus*, проходившей в два этапа. На первом этапе произошел перенос мтДНК от одного из представителей линии альпиноидных гольцов к *S. malma*. Тогда чужеродная мтДНК дала начало филогруппе BERING, которая со временем стала численно преобладать в митохондриальном генофонде *S. malma*. На втором этапе гибридизация *S. malma* и *S. curilus* привела к внедрению в митохондриальный генный пул последнего вида гаплотипов из группы BERING. В этом случае единичные, свойственные *S. curilus* варианты мтДНК, обнаруженные в митохондриальном геномном пуле *S. malma* из северного Охотоморья, могут рассматриваться как следы их прошлого более широкого распространения у последнего вида.

Многочисленные факты свидетельствуют о том, что и среди других гольцов *Salvelinus* межвидовая интрогрессивная гибридизация, сопровождающаяся переносом мтДНК – не редкое событие, а обычное явление ([24, 25, 30, 31, 38, 39] и др.). Более того, прослеживается определенная закономерность в направлении передачи мтДНК. Как

правило, из двух видов гольцов, вступающих в гибридизацию, реципиентом чужеродной мтДНК оказывается вид, имеющий южнее расположенный ареал [16, 24, 25]. Поэтого предложенный сценарий, несмотря на всю его кажущуюся сложность, на наш взгляд, вполне вероятен. Судя по имеющимся данным (см. [38–40], а также цитированную в этих источниках литературу), можно предположить, что похожая ситуация наблюдается в Восточной Пацифике, где возможно произошла опосредованная передача мтДНК в цепи: альпиноидные гольцы → бычья форель *S. confluentus* (Suckley, 1859) → *S. lordii*.

Авторы выражают глубокую признательность В.В. Богатову, А.В. Ермоленко, Ю.Н. Журавлеву, Е.А. Макаренченко, М.Б. Шедько (Биолого-почвенный институт ДВО РАН) за помощь в сборе материала и/или тщательную организацию экспедиционных работ.

Работа была частично профинансирована Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 03-04-49730, 06-04-96004), а также экспедиционными грантами Biological Sciences Directorate (Biotic Surveys and Inventories Program) и International Program Division of the U.S. National Science Foundation, гранты DEB-9400821, DEB-9505031 и DEB-0071655, T.W. Pietsch, руководитель; the Japan Society for the Promotion of Science, грант BSAR-401, К. Амаока, руководитель.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глубоковский М.К., Фролов С.В., Ефремов В.В. и др. Филогенетические связи и систематика гольцовых рыб озера Эльгыгытгын // Природа впадины озера Эльгыгытгын (проблемы изучения и охраны). Магадан: СВКНИИ ДВО РАН, 1993. С. 149–177.
2. Шейко Б.А., Федоров В.В. Класс *Cephalaspidomorpha* – Миноги. Класс *Chondrichthyes* – Хрящевые рыбы. Класс *Holocephali* – Цельноголовые. Класс *Osteichthyes* – Костные рыбы // Каталог позвоночных животных Камчатки и сопредельных морских акваторий. Петропавловск-Камчатский: Камчатский печатный двор, 2000. С. 7–69.
3. Шедько С.В. Список круглоротых и рыб пресных вод побережья Приморья // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 1. Владивосток: Дальнаука, 2001. С. 229–249.
4. Шедько С.В. Обзор пресноводной ихтиофауны // Растительный и животный мир Курильских островов (материалы Международного Курильского проекта). Владивосток: Дальнаука, 2002. С. 118–134.
5. Богущая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. 389 с.
6. Ginatulina L.K., Shedko S.V., Ginatulin A.A., Miroshnichenko I.L. Peculiarities of genetic differentiation of the Dolly Varden *Salvelinus malma* (Salmonidae) inhabiting rivers of the Far East // Biodiversity and dynamics of ecosystems in North Eurasia. V. 1. pt 3: Molecular-genetic bases of biodiversity (animals and plants). Novosibirsk: IC&G, 2000. P. 40–41.
7. Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков В.А. и др. Дивергенция митохондриальной ДНК двух подвигов мальмы *Salvelinus malma* (Salmonidae: Pisces) // Докл. РАН. 2001. Т. 376. № 6. С. 844–846.
8. Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков В.А. Дивергенция мальмы *Salvelinus malma* в азиатской части Северной Пацифики по данным PCR-RFLP-анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2002. Т. 38. № 10. С. 1393–1401. (Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Brykov V.A. The divergence of the Dolly Varden Char *Salvelinus malma* in the Asian Northern Pacific populations Inferred from the PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA // Rus. J. Genetics. 2002. V. 38. № 10. P. 1181–1188.)
9. Brunner P.C., Douglas M.S., Osinov A. et al. Holarctic phylogeography of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* complex) inferred from mitochondrial DNA sequences // Evolution. 2001. V. 55. № 3. P. 573–586.
10. Palva T.K., Palva E.T. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction // FEBS Lett. 1985. V. 192. P. 267–270.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
12. Омельченко В.Т., Салменкова Е.А., Шедько С.В. Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция мальмы (*Salvelinus malma* Walbaum) Курильских островов // Генетика. 2002. Т. 38. № 9. С. 1259–1269. (Omelchenko V.T., Salmenkova E.A., Shedko S.V. Allozyme diversity and genetic divergence of the Dolly Varden *Salvelinus malma* Walbaum from the Kuril Islands // Rus. J. Genetics. 2002. V. 38. № 9. P. 1066–1075.)
13. Uiblein F., Jagsch A., Honsig-Erlenburg W., Weiss S. Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters // J. Fish Biol. 2001. V. 59. Suppl A. P. 223–247.
14. Staden R., Beal K.F., Bonfield J.K. The Staden Package 1998 // Comput. Meth. Mol. Biol. 1999. V. 132. P. 115–130.
15. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment // Brief Bioinform. 2004. V. 5. P. 150–163.
16. Doiron S., Bernatchez L., Blier P. A comparative mitochondrial analysis of the potential adaptive value of arctic charr mtDNA introgression in brook charr populations // Mol. Biol. Evol. 2002. V. 19. P. 1902–1909.
17. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. P. 1572–1574.
18. Lewis P.O. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data // Syst. Biol. 2001. V. 50. P. 913–925.
19. Swofford D.L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Ass., 2002.

20. Adachi J., Hasegawa M. MOLPHY version 2.3: Programs for molecular phylogenetics based on maximum likelihood // Comput. Sci. Monogr. Inst. Stat. Math. 1996. V. 28. 150 p.
21. Cassens I., Mardulyn P., Milinkovitch M.C. Evaluating intraspecific "network" construction methods using simulated sequence data: Do existing algorithms outperform the global maximum parsimony approach? // Syst. Biol. 2005. V. 54. P. 363–372.
22. Roff D.A., Bentzen P. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples // Mol. Biol. Evol. 1989. V. 6. P. 539–545.
23. McElroy D., Moran P., Bermingham E., Kornfield I. REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data // J. Hered. 1992. V. 83. P. 157–158.
24. Glemet H., Blier P., Bernatchez L. Geographic extent of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mtDNA introgression in brook char populations (*S. fontinalis*) from eastern Quebec, Canada // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 1655–1662.
25. Wilson C., Bernatchez L. The ghost of hybrids past: Fixation of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in introgressed population of lake trout (*S. namaycush*) // Mol. Ecol. 1998. V. 7. P. 127–132.
26. Черешнев И.А. Систематика проходного гольца (род *Salvelinus*) из бассейна реки Ионивеем (Чукотский полуостров) // Систематика и экология рыб континентальных водоемов Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1979. С. 114–125.
27. Salmenkova E.A., Omelchenko V.T., Kolesnikov A.A., Malinina, T.V. Genetic differentiation of charrs in the Russian North and Far East // J. Fish Biol. 2000. V. 57. Suppl. A. P. 136–157.
28. Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Frolov S.V. et al. Differences between two subspecies of Dolly Varden, *Salvelinus malma*, revealed by RFLP-PCR analysis of mitochondrial DNA // Environ. Biol. Fish. 2004. V. 69. P. 449–459.
29. Радченко О.А. Генетическая дифференциация северной и южной форм мальмы по данным рестрикционного анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2002. Т. 38. № 4. С. 521–528. (Radchenko O.A. Genetic differentiation inferred from data on restriction analysis of mitochondrial DNA in the Northern and Southern forms of the Dolly Varden Char // Rus. J. Genetics. 2002. V. 38. № 4. P. 421–428.)
30. Радченко О.А. Изменчивость митохондриальной ДНК гольцов рода *Salvelinus*. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2005. 153 с.
31. Радченко О.А. Изменчивость нуклеотидных последовательностей гена цитохрома b митохондриальной ДНК гольцов рода *Salvelinus* // Генетика. 2004. Т. 40. № 3. С. 322–333. (Radchenko O.A. Variability of nucleotide sequences of mitochondrial DNA cytochrome b gene in chars of the genus *Salvelinus* // Rus. J. Genetics. 2004. V. 40. № 3. P. 244–254.)
32. Шедько С.В. Пресноводные рыбы // Экспедиция на НИС "Академик Опарин", рейс № 23. Пресс-релиз. Владивосток: Дальнаука, 1999. С. 13–16.
33. Савваитова К.А., Кузицин К.В., Кончакова М.А., Груздева М.А. Вариации в строении черепа у гольцов (род *Salvelinus*) Камчатско-Курильской гряды и таксономический статус форм // Вопр. ихтиологии. 2004. Т. 44. № 3. С. 313–331.
34. Безверхий В.Л., Плетнев С.П., Набиулин А.А. Очерк геологического строения и развития Курильской островодужной системы и смежных территорий // Растительный и животный мир Курильских островов (материалы Международного Курильского проекта). Владивосток: Дальнаука, 2002. С. 9–22.
35. Crane P.A., Seeb L.W., Seeb J.E. Genetic relationships among *Salvelinus* species inferred from allozyme data // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1994. V. 51. Suppl. 1. P. 182–197.
36. Осинев А.Г., Павлов С.Д. Аллозимная изменчивость и генетическая дивергенция популяций арктического гольца и мальмы (*Salvelinus alpinus*–*S. malma* complex) // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38. № 1. С. 47–61.
37. Осинев А.Г. Эволюционные взаимоотношения между основными таксонами *Salvelinus alpinus*–*S. malma* complex: результаты сравнительного анализа аллозимных данных разных авторов // Вопр. ихтиологии. 2001. Т. 41. Вып. 2. С. 167–183.
38. Phillips R.B., Sajdak S.L., Domanico M.J. Relationships among charrs based on DNA sequences // Nordic J. Freshw. Res. 1995. V. 71. P. 378–391.
39. Redenbach Z., Taylor E.B. Evidence for bimodal hybrid zones between two species of char (Pisces: *Salvelinus*) in northwestern North America // J. Evol. Biol. 2003. V. 16. P. 1135–1148.
40. Grewe P.M., Billington N., Hebert P.D.N. Phylogenetic relationships among members of *Salvelinus* inferred from mitochondrial DNA divergence // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1990. V. 47. № 5. P. 984–991.