

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 11, 2022

НОМЕР ПОСВЯЩЕН ЮБИЛЕЮ ЛАБОРАТОРИИ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. АКАДЕМИКА Ю.П. АЛТУХОВА ИОГЕН РАН

К 50-летию юбилею лаборатории популяционной генетики
им. академика Ю.П. Алтухова ИОГен РАН

Д. В. Политов, Е. А. Салменкова

1223

Обзорные и теоретические статьи

Дендрогеномика – новая междисциплинарная область исследований адаптивного генетического потенциала лесных древесных популяций, интегрирующая дендрохронологию, дендрэкологию, дендроклиматологию и геномику

К. В. Крутовский

1225

Генетика растений

Древняя и современная гибридизация сибирской кедровой сосны и кедрового стланика на юге Якутии

*М. М. Белоконь, Ю. С. Белоконь, Е. А. Петрова, Г. В. Васильева,
А. П. Ефимова, Е. С. Захаров, С. Н. Горошкевич, Д. В. Политов*

1240

Молекулярная филогения российских видов рода *Spiraea* (Rosaceae) по данным нуклеотидной изменчивости региона ITS ядерной рДНК

Т. А. Полякова, А. В. Шатохина, Д. В. Политов

1251

Генетика животных

Популяционно-генетическая структура степного волка России и Казахстана по микросателлитным локусам

*П. А. Казимиров, С. В. Леонтьев, А. В. Нечаева, М. М. Белоконь,
Ю. С. Белоконь, А. Я. Бондарев, А. В. Давыдов, Д. В. Политов*

1261

Соотношение полов в потомстве моногамного вида птиц – красавки *Anthropoides virgo*

Е. А. Мудрик, Е. И. Ильяшенко, К. А. Постельных, О. А. Горошко, Д. В. Политов

1273

Внутривидовая дифференциация азиатской горбуши по данным о последовательности митохондриального гена *cytb*

Д. А. Зеленина, Л. А. Животовский, В. А. Сошнина, О. Ю. Вилкова, М. К. Глубоковский

1280

Морфологическая, экологическая и генетическая изменчивость сига *Coregonus lavaretus sensu lato* из верхнего и среднего течения р. Лены

*Н. А. Бочкарев, Д. С. Сендек, А. В. Катохин, Е. И. Зуйкова, А. Н. Матвеев,
Л. А. Пестрякова, Е. С. Захаров, В. П. Самусёнок, А. Л. Юрьев, Д. В. Политов*

1292

Изучение популяционной структуры байкальских сиговых рыб на основе полиморфизма микросателлитных локусов

Т. В. Сидорова, В. В. Смирнов, С. В. Кирильчик, Л. В. Суханова

1311

Генетика человека

Частоты гаплогрупп Y-хромосомы и процессы миграции в трех поколениях жителей Москвы

И. Г. Удина, А. С. Грачева, О. Л. Курбатова

1325

Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови облученных лиц – итоги исследований

Н. С. Кузьмина, Н. Ш. Лаптева, А. В. Рубанович

1334

Contents

Vol. 58, No. 11, 2022

THE ISSUE IS DEDICATED TO THE ANNIVERSARY OF THE ACADEMICIAN
YU.P. ALTUKHOV LABORATORY OF POPULATION GENETICS, INSTITUTE
OF GENERAL GENETICS, RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

Celebrating the 50th Anniversary of the Academician Yu.P. Altukhov Laboratory
of Population Genetics of the Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences

D. V. Politov and E. A. Salmenkova

1223

Reviews and Theoretical Articles

Dendrogenomics – A New Interdisciplinary Field to Study Adaptive Genetic Potential
of Forest Tree Populations by Integrating Dendrochronology,
Dendroecology, Dendroclimatology and Genomics

K. V. Krutovsky

1225

Plant Genetics

Ancient and Modern Hybridization of Siberian Stone Pine
and Dwarf Siberian Pine in the South of Yakutia

*M. M. Belokon, Yu. S. Belokon, E. A. Petrova, G. V. Vasileva,
A. P. Efimova, E. S. Zakharov, S. N. Goroshkevich, and D. V. Politov*

1240

Molecular Phylogeny of Russian Species of the Genus *Spiraea* (Rosaceae)
according to the Nucleotide Variability of Its Nuclear rDNA Region

T. A. Poliakova, A. V. Shatokhina, and D. V. Politov

1251

Animal Genetics

Population Genetic Structure of the Steppe Wolf of Russia
and Kazakhstan by Microsatellite Loci

*P. A. Kazimirov, S. V. Leontyev, A. V. Nechaeva, M. M. Belokon,
Yu. S. Belokon, A. Ya. Bondarev, A. V. Davydov, and D. V. Politov*

1261

Offspring Sex Ratio in the Monogamous Bird Species – Demoiselle Crane *Anthropoides virgo*

E. A. Mudrik, E. I. Ilyashenko, K. A. Postelnykh, O. A. Goroshko, and D. V. Politov

1273

Intra-Species Differentiation of the Asian Pink Salmon Based
on the Mitochondrial *cytb* Gene

*D. A. Zelenina, L. A. Zhiotovskiy, V. A. Soshnina,
O. Yu. Vilkova, and M. K. Glubokovskiy*

1280

Morphological, Ecological and Genetic Variability Diversity of Whitefish
Coregonus lavaretus sensu lato from Upper and Middle Stream of Lena River

*N. A. Bochkarev, D. S. Sendek, A. V. Katokhin, E. I. Zuykova,
A. N. Matveev, L. A. Pestryakova, E. S. Zakharov,
@B. П. Самусенок, А. Л. Юрьев, and D. V. Politov*

1292

Study of Population Structure of Baikal Whitefish Based
on the Polymorphism of Microsatellite Loci

T. V. Sidorova, V. V. Smirnov, S. V. Kirilchik, and L. V. Sukhanova

1311

Human Genetics

Frequencies of Y-Chromosome Haplogroups and Migration Processes
in Three Generations of Moscow Residents

I. G. Udina, A. S. Gracheva, and O. L. Kurbatova

1325

Hypermethylation of Gene Promoters in Blood Leukocytes
of Irradiated Individuals – Final Research Results

N. S. Kuzmina, N. Sh. Lapteva, and A. V. Rubanovich

1334

К 50-ЛЕТНЕМУ ЮБИЛЕЮ ЛАБОРАТОРИИ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. АКАДЕМИКА Ю.П. АЛТУХОВА ИОГЕН РАН

© 2022 г. Д. В. Политов¹, *, Е. А. Салменкова¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: dmitri_p@inbox.ru

Поступила в редакцию 05.07.2022 г.

После доработки 06.07.2022 г.

Принята к публикации 07.07.2022 г.

DOI: 10.31857/S001667582211008X

Лаборатория популяционной генетики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН в 2022 г. отмечает свой 50-летний юбилей. Лаборатория носит имя академика Юрия Петровича Алтухова, ее основателя и бессменного руководителя с момента создания в 1972 г. и до ухода из жизни Ю.П. Алтухова в 2006 г. Создание лаборатории было инициировано директором ИОГен АН СССР академиком Н.П. Дубининым, который пригласил Ю.П. Алтухова, возглавлявшего лабораторию с аналогичным названием в Институте биологии моря Дальневосточного научного центра АН СССР. Первыми сотрудниками новой лаборатории в ИОГен стали Б.А. Калабушкин, Т.В. Малинина, Е.А. Салменкова, Т.А. Ракицкая (Новикова), А.Н. Милишников, Е.Я. Тетушкин, А. Гнучева, Б.В. Шиленко, Б.А. Абдуллаев. Параллельно с исследованиями лососевых рыб (тематика, унаследованная с владивостокского периода) и анализом модельных популяций дрозофилы (Е.Ю. Победомосцева, А.Г. Бернашевская (Имашева), Л.П. Филатова), в лаборатории изучались популяции рыб из радиоактивно загрязненных водоемов в районах Восточно-Уральского радиоактивного следа и проводились работы по селекции хлопчатника. В последующие годы в ряды коллектива лаборатории влились И.И. Сусков, О.Л. Курбатова, В.И. Слынько, В.Д. Прохоровская, С.К. Семенова, Р.И. Хильчевская, К.И. Афанасьев, Н.И. Иващенко, Л.А. Животовский и др.

С конца 1970-х гг. в лаборатории развернуты исследования полиморфизма белковых и иммуногенетических маркеров в популяциях человека. Сформулировано представление об оптимуме гетерозиготности и роли стабилизирующего отбора в поддержании генетического разнообразия, разработан популяционно-генетический подход к проблеме адаптивной нормы (Ю.П. Алтухов, О.Л. Курбатова, И.И. Сусков, Т.В. Малинина, Л.А. Животовский, Ю.Е. Дуброва, К.И. Афанасьев). С 1980-х гг. Ю.П. Алтухов с сотрудниками (К.В. Крутовский,

Н.И. Гафаров, С.А. Мальцев, Д.В. Политов, Ю.С. Белоконь, М.М. Белоконь, О.П. Малоченко) приступили к исследованию популяционной генетики новых экологически и экономически важных объектов – хвойных растений. Было установлено, что в популяциях древесных растений, кажущихся непрерывными на больших пространствах ареалов, действуют те же механизмы, что в любых других популяциях животных и растений, т.е. вместо неограниченной панмиксии существует система подразделенных популяций с определенной степенью изоляции. Большое число работ лаборатории посвящено выявлению связей моногенных и полигенных, как правило, адаптивно нагруженных, признаков в популяциях. Эффекты отбора, варьирующего по направлению на разных стадиях онтогенеза, были открыты и подробно исследованы в нескольких поколениях горбуши (Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова, В.Т. Омельченко, Б.А. Калабушкин). В связи с катастрофической ситуацией с естественным воспроизводством осетровых рыб на Каспии встал вопрос о генетическом мониторинге искусственного размножения русского и сибирского осетров, севрюги, белуги, стерляди (Г.Д. Рябова и др.). Для стабилизации сортов путем поддержания генетического разнообразия Ю.П. Алтухов на хлопчатнике разработал метод селекции, сочетающий умеренный направленный отбор по признакам продуктивности со стабилизирующим отбором по адаптивно-значимым признакам. Впоследствии этот метод оказался эффективным и в поддержании других ценных сортов растений, а также пород животных (работы Н.А. Сарсенбаева, А.И. Гундаева, В.А. Жидковой, И.Г. Моисеевой).

В 1994 г. пять сотрудников лаборатории (Д.В. Политов, К.И. Афанасьев, Т.В. Малинина, А.А. Махров, В.Б. Федоров) приняли участие в масштабной международной научной экспедиции в российской Арктике “Экология тундры-94”, что положило начало изучению новых объектов в лаборатории – сиговых рыб и арктиче-

ских гольцов комплекса *Salvelinus alpinus*. В фокусе этих исследований – механизмы формо- и видообразования, в том числе роль межвидовой гибридизации и интрогрессии, симпатрического видообразования, неконгруэнтности морфологических и молекулярных филогенетических реконструкций (Д.В. Политов, Н.Ю. Гордон, С.Н. Балдина). Выполнены работы по генетическим взаимоотношениям среди нескольких видов (форм) гольцов рода *Salvelinus* со спорным таксономическим статусом в условиях аллопатричного и симпатричного обитания (Е.А. Салменкова). Проведено обширное геногеографическое исследование дальневосточных гольцов – мальмы, кунджи, а также изучены популяционно-генетические процессы у акклиматизированных видов рыб – тихоокеанской горбуши на Европейском Севере и дальневосточного пиленгаса в бассейне Азовского моря (Е.А. Салменкова, Н.В. Гордеева). С конца 1990-х гг. Ю.П. Алтуховым и сотрудниками публикуется цикл работ по анализу связей популяционного генетического разнообразия со скоростью роста, полового созревания и продолжительностью жизни. Это было последним крупным исследованием Юрия Петровича. В октябре 2006 г. после тяжелой болезни он скончался. Один из авторов этой статьи (Д.В. Политов) – ученик и сотрудник Ю.П. Алтухова – стал сначала и.о., а затем заведующим лабораторией.

Позже в число объектов лаборатории вошли птицы (М.М. Белоконь, Е.А. Мудрик, Ю.С. Бело-

конь, А.В. Нечаева), мелкие млекопитающие (М.М. Белоконь, Ю.С. Белоконь) и самый крупный хищник – волк (М.С. Талала, П.А. Казимиров, А.В. Нечаева, Д.В. Политов). Новый импульс популяционно-генетическим и геномным исследованиям хвойных дало возвращение в лабораторию К.В. Крутовского в 2013 г. Выполняется изучение генетической структуры популяций ели и сибирской кедровой сосны с помощью традиционных и современных маркеров, функциональных генов и полногеномных данных. Активно изучается генетика популяций и филогения спирей – нового и перспективного объекта из покрытосеменных растений (Т.А. Полякова, А.В. Шатохина).

В 2022 г. в ИОГен РАН проводится очередная, третья по счету конференция, получившая название созвучно основному труду Юрия Петровича “Генетические процессы в популяциях”, которая начнется 11 октября, в день рождения Ю.П. Алтухова. В этот юбилейный для лаборатории год хочется пожелать большего внимания правительства к проблемам генетического скрининга и мониторинга популяционного уровня организации живой материи, поднятым в свое время Ю.П. Алтуховым. Необходимо оказывать разностороннюю поддержку как прикладным, так и фундаментальным исследованиям в области генетики природных и искусственных популяций, которые обеспечивают генетическую, экологическую, продовольственную и природоохранную безопасность страны.

**ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ**

УДК 575.22:577.29:581.5:630*4

**ДЕНДРОГЕНОМИКА – НОВАЯ МЕЖДИСЦИПЛИНАРНАЯ ОБЛАСТЬ
ИССЛЕДОВАНИЙ АДАПТИВНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА
ЛЕСНЫХ ДРЕВЕСНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ, ИНТЕГРИРУЮЩАЯ
ДЕНДРОХРОНОЛОГИЮ, ДЕНДРОЭКОЛОГИЮ,
ДЕНДРОКЛИМАТОЛОГИЮ И ГЕНОМИКУ**© 2022 г. К. В. Крутовский^{1, 2, 3, 4, *}¹Гёттингенский университет им. Георга-Августа, Гёттинген, 37077 Германия²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия³Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии,
Красноярск, 660041 Россия⁴Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, Воронеж, 394087 Россия

*e-mail: kkrutovsky@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2022 г.

После доработки 21.06.2022 г.

Принята к публикации 23.06.2022 г.

Данный обзор посвящен дендрогеномике, новой междисциплинарной области исследований, интегрирующей дендрохронологию, дендрозоологию, дендроклиматологию, генетику и геномику и позволяющей на основе совместного анализа данных, полученных дендрологическими и геномными методами, исследовать на новом уровне важные биологические проблемы, в частности такие, как временная динамика формирования границы леса, пространственно-временная структура популяций, а также изучение адаптивного генетического потенциала лесных древесных популяций. Данные проблемы особенно актуальны в контексте глобального потепления, которое способствует активному продвижению леса на север и горные высоты, ранее малоприспособленные для древесных растений, а также для понимания достаточно ли наблюдаемого уровня адаптивного генетического потенциала лесных древесных популяций для их выживания в новых климатических условиях.

Ключевые слова: адаптация, геномика, геномная селекция, геномное редактирование, годовые древесные кольца, дендрогеномика, дендрохронология, дендроклиматология, дендрозоология, ДНК секвенирование, генетические ассоциации, ель, засуха, инвазия, лиственница, пихта, сосна, хвойные.

DOI: 10.31857/S0016675822110054

Этот специальный выпуск журнала посвящен юбилею выдающегося ученого-генетика Юрия Петровича Алтухова, примечательными чертами которого, присущими ему, как и всякому настоящему исследователю, были широкий взгляд, стремление к новому, выход за рамки своей дисциплины. Благодаря ему и под его руководством многие новые междисциплинарные области исследования были заложены и успешно развивались в созданной им лаборатории популяционной генетики, в том числе такая интересная и важная область исследований, как лесная генетика. Будучи его учеником я также всегда стремился следовать этому. В частности, на базе Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета (СФУ) в г. Красноярске нами был создан один из первых в стране научно-

образовательный центр геномных исследований в 2012 г., а через два года, в 2014 г. была создана первая и до сих пор единственная в стране лаборатория лесной геномики. Одно из современных направлений, которое развивается в рамках этой лаборатории совместно с сотрудниками научно-образовательной лаборатории дендрозоологии и экологического мониторинга Хакасского технического института (филиала СФУ), является дендрогеномика – новая междисциплинарная область, интегрирующая дендрохронологию, дендрозоологию, дендроклиматологию, генетику и геномику и позволяющая на основе совместного анализа данных, полученных дендрологическими и геномными методами, исследовать на новом уровне важные биологические проблемы, в частности такие, как временная динамика формирования границы

леса, пространственно-временная структура популяций, а также изучение адаптивного генетического потенциала лесных древесных популяций. Данные проблемы особенно актуальны в контексте глобального потепления, которое способствует активному продвижению леса на север и горные высоты, ранее малоприспособленные для древесных растений, а также для понимания достаточно ли наблюдаемого уровня адаптивного генетического потенциала лесных древесных популяций для их выживания в новых климатических условиях.

ГЛОБАЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ КЛИМАТА И АДАПТИВНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛЕСНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Имеют ли современные лесные популяции адаптивный генетический потенциал, достаточный для адаптации к изменению климата и позволяющий им выжить в условиях более частых и сильных средовых стрессов, таких как катастрофические и повторяющиеся засухи, пожары и инвазии вредителей, является одним из наиболее острых вопросов, связанных с природоохранными мероприятиями и определяющих их стратегию [1–3]. Бореальные (северные) леса, представляющие 30% (1224 млн га) всех лесов мира, особенно важны в этом отношении, и в первую очередь бореальные леса России (главным образом Сибири и Дальнего Востока), составляющие 69% всех бореальных лесов на планете [4]. Благополучие бореальных экосистем определяется ключевыми системообразующими лесными древесными видами, в первую очередь хвойными, такими как ель, лиственница, пихта и сосна [5]. Поэтому большинство исследований, представленных в этом миниобзоре, сосредоточены в первую очередь на этих видах. Для данных видов, как и для большинства хвойных, характерны высокая фенотипическая пластичность и высокий уровень генетической изменчивости. Поэтому вызывает огромный интерес как эта изменчивость влияет на рост и адаптацию древесных видов [6–8].

ДЕНДРОХРОНОЛОГИЯ, ГОДИЧНЫЕ КОЛЬЦА ПРИРОСТА ДРЕВЕСИНЫ И ДЕНДРОФЕНОТИПЫ

Дендрохронология путем изучения изменчивости и датировки годичного прироста древесины изучает влияние экологических факторов и событий в истории лесных популяций на рост и развитие деревьев [9, 10]. Годичные кольца прироста древесины содержат много информации об индивидуальной реакции деревьев на биотические и абиотические факторы окружающей среды, такие как динамика численности вредителей, температура, осадки [11–14]. Они регистрируют засухи, инвазии вредителей и другие значительные измене-

ния среды, которые сильно влияют на годичный прирост [15–26]. Изменения годичного прироста древесины можно синхронизировать по времени с реальными событиями, используя климатические и метеорологические данные. Основываясь на этой информации и индивидуальной реакции дерева, можно выделить разные индивидуальные дендрофенотипы деревьев и прокоррелировать их изменчивость с генетической изменчивостью [27–42].

Наиболее часто используемые параметры дендрофенотипической изменчивости – это величина годового кольцевого прироста (tree ring width – TRW), которая может быть конвертирована в годовой прирост базальной площади (annual basal area increment – BAI), стандартизированная TRW (standardised ring width index – RWI), средняя величина кольцевого прироста (average tree ring width – AvTRW) и ее дисперсия (variance of tree ring width – VarTRW). Последние два параметра были использованы, например, для изучения как средняя гетерозиготность дерева по совокупности генетических маркеров может влиять на величину прироста как показателя гетерозиса и на стабильность (дисперсию) прироста как показателя гомеостаза [27].

Другие важные индивидуальные дендрофенотипы, предложенные Lloret et al. [43] – это индексы сопротивления $R_t (= G_d/G_{prev})$, устойчивости $R_s (= G_{post}/G_{prev})$ и восстановления $R_c (= G_{post}/G_d)$, где G_{prev} – средний прирост (измеренный используя либо TRW, либо BAI) в течение двух–трех лет до стресса (например, засухи или инвазии вредителей), G_d – средний прирост в течение стресса и G_{post} – средний прирост в течение двух–трех лет после стресса (рис. 1; см. также [44–54] для обзора этих, а также аналогичных индексов). Они отражают индивидуальный ответ дерева на биотический или абиотический стресс и часто используются для анализа стабильности индивидуального прироста деревьев при воздействии засухи (например, [55–59]) и других стрессовых событий, например инвазий вредителей [60–62].

Например, используя базу данных годичных колец выживших и уже мертвых деревьев из 118 лесонасаждений восьми видов покрытосеменных и 14 голосеменных (>3500 деревьев), в исследовании [63] было показано, что устойчивость роста во время сильных засух и способность к возобновлению роста определяют способность пережить будущие засухи. Было обнаружено, что деревья, которые погибли во время сильной засухи, были менее устойчивы также к предыдущим нелетальным засухам по сравнению с выжившими деревьями того же вида.

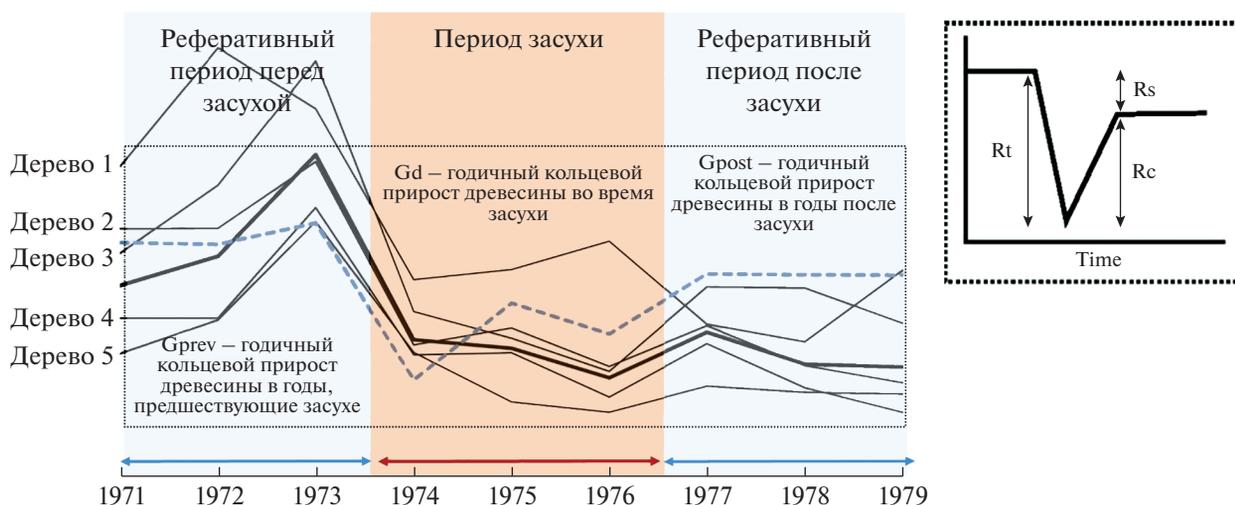


Рис. 1. Черные линии обозначают годичный кольцевой прирост древесины (TRW – tree-ring width) на примере пяти деревьев лиственницы сибирской из одной из популяций Кузнецкого Алатау в Южной Сибири [57] за период с 1971 по 1979 гг., включая период засухи в 1974–1976 гг. Черная жирная линия обозначает TRW в среднем на популяцию. Голубая прерывистая линия обозначает стандартизированный индекс осадков-эвапотранспирации для района исследования (SPEI – standardized precipitation-*evapotranspiration* index). Условно обозначены также измерения дендрофенотипов: индексы сопротивления $R_t (= G_d/G_{prev})$, устойчивости $R_s (= G_{post}/G_{prev})$ и восстановления $R_c (= G_{post}/G_d)$, где G_{prev} – средний прирост в течение трех лет до засухи, G_d – средний прирост в течение засухи и G_{post} – средний прирост в течение трех лет после засухи.

ДЕНДРОГЕНОМИКА

Геномика позволяет секвенировать и аннотировать геномы индивидуальных деревьев и генотипировать их по многим генам. В частности, геномы нескольких основных видов хвойных полностью просеквенированы и аннотированы (см. для обзора [64–66], включая сибирскую лиственницу *Larix sibirica* Ledeb. [67]). Наличие таких геномных данных и референсных геномов позволило разработать большое число высокоизменчивых генетических маркеров, таких как микросателлиты (например, [68–71]). Данные маркеры в основном представляют некодирующие районы и являются селективно-нейтральными. Они очень удобны для изучения пространственной структуры популяций, их дифференциации вследствие изоляции, миграции, потока генов, родства, индивидуального и популяционного уровня изменчивости и там, где важно исключить влияние отбора или можно его игнорировать. Однако данные маркеры не подходят для изучения связи между отдельными генами и контролируемыми ими индивидуальными фенотипами. Полногеномное секвенирование является наиболее информативным методом генотипирования и изучения индивидуальной генетической изменчивости по таким важным функциональным генам. Но из-за огромного размера генома хвойных – от 12 млрд пн (гигабаз – Гб) у лиственницы сибирской [67] до 31 Гб у сахарной сосны, *Pinus lambertiana* Dougl. [72] – этот метод все еще непозволительно дорог для индивидуального генотипирования большого числа деревьев. В каче-

стве альтернативы используются методы частичного секвенирования генома, такие как таргетное секвенирование (например, [73–76]) и секвенирование районов, связанных с сайтами рестрикции, – restriction-site associated DNA sequencing (RADseq) (например, [28–30, 39, 77–81]).

Возможность индивидуально генотипировать большое число деревьев в популяциях по большому числу генов и генетических маркеров позволяет связать генетическую изменчивость с изменчивостью конкретных дендрофенотипов [27–29, 31–42]. Такой междисциплинарный подход позволяет интегрировать дендрохронологию, дендрэкологию, дендроклиматологию, генетику и геномику и был впервые использован в работах [27–29] и приобрел популярность в последние годы [31–42]. Мы предложили назвать эту новую дисциплину, которая развивает данный подход, дендрогеномикой, а сам термин “дендрогеномика” впервые был предложен нами в статье [30].

Краткий обзор наиболее недавних опубликованных исследований в данной области и некоторых неопубликованных данных автора приведен в табл. 1, и здесь мы выделили только несколько важных проблем, для решения которых дендрогенетика и дендрогеномика оказались очень эффективными. Конечно, ими не исчерпывается весь спектр исследований дендрогеномики. Ограниченный размер журнальной статьи не позволяет описать все исследования в данной области, поэтому автор вынужден ограничиться только несколькими наиболее недавними и характерными

примерами и заранее приносит извинения, если какие-то важные исследования и публикации не вошли в данный миниобзор.

Динамика границы леса

Ожидается, что граница леса будет подниматься на более высокие высоты и продвигаться дальше на север в связи с глобальным потеплением [82]. Хотя этот процесс очень гетерогенный [83], важно понимать насколько он устойчив, насколько он связан с миграцией семян и переносом пыльцы, за счет каких деревьев происходит формирование популяций на границе леса, которая фактически является экотонем, какова репродуктивная структура этих популяций. Чтобы ответить на некоторые эти вопросы, мы исследовали дендрохронологически и генетически деревья горной тсуги (*Tsuga mertensiana* Bong. Carr) вдоль одного из горных склонов на п-ове Кенай, Аляска, определив с помощью кернов их точный возраст и прогенотипировав их по однонуклеотидным полиморфизмам (т.н. “снипам” от английского SNPs, означающего single nucleotide polymorphisms), используя секвенирование ДНК, связанной с сайтами рестрикции двух рестриктаз *SphI* и *MluCI* (ddRADseq) [28]. Сочетание двух подходов — дендрохронологического и геномного — позволило установить точную возрастную, генетическую, родственную и репродуктивную структуру деревьев на границе леса, используя 353 высокоинформативных генетических маркера-снипа, отобранных из 171019 снипов (табл. 1). Средняя дистанция, на которую распространялись семена, была всего 73 м, однако родство между деревьями в популяции было низким, а миграция семян и поток генов высокими.

В исследовании [84] с помощью дендрохронологии и кольцевого прироста был определен возраст 194 деревьев лиственницы Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) на северной границе ареала обитания вида на п-ове Таймыр (север Восточной Сибири), а с помощью 16 полиморфных микросателлитных локусов установлен также их генотип. Обнаружено, что преобладающий тип размножения в этом районе клональный (58.76%) путем распространения рамет на короткие расстояния. При этом возраст клонов часто достигал 2200 лет. Авторы предполагают, что особи с клональным способом размножения поддерживались естественным отбором, поскольку это снижало вероятный риск вымирания в суровых условиях, но теперь эта способность может стать неадаптивной и замедлять расширение границы леса в новых условиях сильно повышающихся в настоящее время температур.

Совместное изучение индивидуальных генетических, дендрохронологических и дендроклиматических данных позволило детально изучить

структуру популяции и индивидуальный рост ели канадской, или ели белой (*Picea glauca* (Moench) Voss) на границе леса в Аляске [85]. Данное исследование показало, что 1) особенности микросреды в целом оказали большее влияние на показатели роста, чем генетическое сходство между деревьями; 2) влияние климата на рост различалось между участками, но было меньше, чем влияние размера дерева; 3) большая внутриндивидуальная изменчивость ростовых реакций может свидетельствовать о высокой фенотипической пластичности ели белой, которая может амортизировать кратковременные изменения окружающей среды и, таким образом, позволяет выдерживать современные меняющиеся климатические условия.

Пространственно-временная структура популяций

Через изучение динамики кольцевого прироста в сопоставлении с климатическими и эпидемиологическими данными методами дендрохронологии можно понять, как разные абиотические (температура, осадки, аридность и т.д.) и биотические (вспышки вредителей, инвазии фитопатогенов и пр.) средовые факторы могут влиять на рост деревьев. При этом важно вычлнить влияние и других факторов, таких, например, как генетическое родство и пространственная структура. В работе [36], используя в комплексе индивидуальные дендрохронологические, генетические и пространственные данные для двух популяций ели обыкновенной (*Picea abies* L.), было показано, что генетическое сходство не было связано с изменчивостью прироста древесины, тогда как пространственное расположение деревьев (т.е. особенности микросреды) влияло на прирост достаточно сильно.

В комплексном мультидисциплинарном исследовании [32] с использованием дендрохронологических, дендроэкологических и генетических данных было изучено как разные лесохозяйственные мероприятия и методы лесопользования и управление лесными угодьями влияют на пространственно-возрастную структуру лесонасаждений (табл. 1).

Совместный анализ генетических данных и долговременной физиологической информации, полученной на основе изучения годичных колец, был использован для изучения старовозрастного лесонасаждения пихты испанской (*Abies pinsapo* Boiss.), заложенного еще в 1910-х гг. в центрально-восточной Испании (~500 км к северу от естественного ареала распространения вида), на предмет его пригодности в качестве *ex situ* популяции в природоохранных целях [86].

Представленные выше примеры мультидисциплинарных дендрогенетических исследований

Таблица 1. Примеры исследований в области дендрогенетики и дендрогеномики

Популяция (публикация)	Дендрологические и другие данные	Генетические и геномные данные	Основные результаты
Лиственница сибирская (<i>Larix sibirica</i> Ledeb.)			
100 деревьев из двух популяций в Восточной Сибири [27]	Возраст, ширина кольцевого прироста и его дисперсия	Восемь ядерных микросателлитных маркеров	Не обнаружено достоверной связи между ростом дерева и индивидуальной гетерозиготностью
Пять популяций, расположенных через 30–50 км в лесостепной зоне вдоль предгорий Батеневского хребта (Кузнецкий Алагау, Южная Сибирь, Россия), 180 деревьев (35 на популяцию) (неопубл. данные автора*)	Возраст, ширина кольцевого прироста, индивидуальные дендротипы (сопротивления R _t , устойчивости R _s и восстановления R _c), отражающие реакцию роста дерева на засуху для 5 периодов засухи [57]	44748 снипов (SNPs), генотипированных в 127 деревьях с помощью ddRAD с использованием двух рестриктаз <i>EcoRI</i> и <i>MseI</i>	22 снипа коррелировали со средней шириной годичных колец (mean TRW) и 288 – с коэффициентом вариации ширины колец (var TRW); обнаружены также тремя различными методами 356 снипов, частоты которых коррелировали с дендротипами, отражающими ответ на засуху, и проведена детальная аннотация их геномных районов
Тсуга горная (<i>Tsuga mertensiana</i> Bong. Carr)			
163 дерева вдоль градиента высоты, от альпийской границы деревьев до низовья долины в бассейне р. Палмер-Крик в Национальном лесу Чугач на полуострове Кенай, Аляска [28, 29]	Возраст, ширина кольцевого прироста и его дисперсия	4665 снипов, полученных с помощью ddRADseq с использованием двух рестриктаз <i>SphI</i> и <i>MluCI</i>	Установлена точная возрастная, генетическая, родственная и репродуктивная структура деревьев на границе леса, используя 353 высокоинформативных генетических маркеров-снипов (отобранных из 171 019 снипов); средняя дистанция, на которую распространялись семена, была всего 73 м, однако родство между деревьями было низким; признаков клонального размножения не обнаружено [28]; не обнаружено существенной связи между ростом деревьев и индивидуальной гетерозиготностью, но была значительная положительная связь между средней шириной кольцевого прироста и его дисперсией, подразумевающая, что в целом быстрорастущие деревья в стрессовых условиях, таких как альпийская граница леса, растут настолько независимо от уровня индивидуальной гетерозиготности [29]
Пихта европейская (<i>Abies alba</i> Mill.)			
193 дерева из Национального парка “Баварский лес”, переживших сильную засуху в 1976 г. [31]	Возраст, ширина кольцевого прироста, индивидуальные дендротипы (R _t , R _s и R _c), отражающие реакцию роста дерева на засуху	130 снипов, прогенотипированных в 103 генах, чья изменчивость предположительно связана с ответом на различные стрессы	Изменчивость 15 генов, включая гены фотосинтеза и устойчивости к засухе, была связана с изменчивостью дендротипов

Таблица 1. Продолжение

Популяция (публикация)	Дендрологические и другие данные	Генетические и геномные данные	Основные результаты
328 деревьев на трех постоянных участках с разным лесохозяйственным управлением [32]	Возраст, ширина кольцевого прироста, пространственные данные	Пять ядерных микросателлитных маркеров	Сформировалась сходная пространственная структура с точки зрения возраста деревьев и нейтрального генетического разнообразия, несмотря на различные методы лесохозяйственного управления
147 деревьев из 11 районов происхождения в испытательном участке географических культур Поррау, расположенном за пределами естественного ареала или обыкновенной на высоте 250 м над уровнем моря на северо-востоке Австрии [35]	Ель европейская (<i>Picea abies</i> L.) Дендроклиматические временные ряды, индивидуальные дендрофенотипы (Rt, Rs, Rc и относительной устойчивости RR), отражающие индивидуальную реакцию роста дерева на засуху; характеристики древесины и взаимосвязи роста с климатом	~1700 снипов, протенотипированных с помощью Illumina InfiniumHD iSelect BeadChip, включающего 3257 снипов (SNP assays)	Обнаружены значимые ассоциации между 29 снипами и признаками, связанными с засухой, влиянием климата на рост и свойствами древесины, которые объясняли от 11 до 43% фенотипической изменчивости
482 дерева из двух популяций в Южной и Центральной Европе [36]	Возраст, ширина кольцевого прироста, климатические, пространственные данные	11 несцепленных ядерных микросателлитных маркеров	Генетическое сходство не было связано с изменчивостью прироста древесины, тогда как пространственное расположение деревьев (т.е. особенности микросреды) влияло достаточно сильно
Три участка на южной окраине ареала вида в пределах природного заповедника Камполино (северные Апеннины, Италия) и два участка в центральной части ареала вида на территории Баварского национального парка (Богемский массив, Германия); всего 518 взрослых деревьев и 604 саженца [37]	Ширина кольцевого прироста, преобразованная в приращение базальной площади (BAI); 11 дендрофенотипов, сгруппированных в три класса признаков, которые описывают (1) индивидуальный возраст и скорость роста, (2) индивидуальную чувствительность к климату и (3) индивидуальные реакции роста на прошлые экстремальные климатические явления (сопротивление, восстановление и устойчивость); три пространственные переменные; климатические данные	11 несцепленных ядерных и три хлоропластных микросателлитных локуса, использованных для анализа семейной структуры с целью определения репродуктивного успеха	Изучено влияние дендротипических, пространственных и климатических переменных на индивидуальный рост и репродуктивный успех деревьев, который был положительно связан со скоростью роста и возрастом дерева; на материнский репродуктивный успех также положительно влияла корреляция между ростом и средней температурой предыдущего вегетационного сезона; деревья с наивысшей приспособленностью оказались те, которые способны поддерживать высокие темпы роста, несмотря на потенциальные ограничения роста, вызванные репродуктивными затратами и лимитирующими климатическими условиями

Таблица 1. Продолжение

Популяция (публикация)	Дендрологические и другие данные	Генетические и геномные данные	Основные результаты
233 дерева из географических культур, представляющих 38 популяций с почти всего ареала вида [33]	Ширина кольцевого прироста, климатические данные	Сосна Веймута (<i>Pinus strobus</i> L.) 153 снипа, прогенотипированных с помощью Sequenom iPLEX Gold MassARRAY, который включал снипы 52 генов-кандидатов, связанных с ростом и фенологией, ранее идентифицированных у <i>Picea glauca</i> , и 68 генов, случайно выбранных из генома	Обнаружены генотип–дендрофенотип ассоциации подтвердили 9 генов-кандидатов, идентифицированных ранее в ассоциативном исследовании связи генетической изменчивости с изменчивостью средовых факторов
194 дерева в северно-центральной части Сибири на юге Таймырского полуострова [84]	Листоветвница Гмелина (<i>Larix gmelinii</i> (Rupr.) Rupr.) Возраст, ширина кольцевого прироста, пространственные данные	16 ядерных микросателлитных маркеров	Обнаружено, что преобладающим типом размножения был клональный (58.76%) путем распространения рамет на короткие расстояния; наблюдались клональные группы из двух и более особей; возраст некоторых клонов достигает 2200 лет, что совпадает с серьезным изменением окружающей среды, вынудившим отступить линию деревьев в регионе; особи с клональным способом роста, по-видимому, отобраны и подерживались естественным образом, поскольку это снижает вероятный риск вымирания в суровых условиях, хотя теперь это может быть неадаптивно и препятствовать расширению леса при сильно повышающихся в настоящее время температурах
42 дерева в старом лесонасаждении, созданном в 1910-х гг. в центрально-восточной Испании (~500 км к северу от естественного ареала распространения вида), изученном на предмет его пригодности для <i>ex situ</i> консервации [86]	Пихта испанская (<i>Abies pinsapo</i> Boiss.) Ширина кольцевого прироста и дискриминация изотопа углерода ¹³ C (Δ ¹³ C) для оценки динамики роста и эффективности использования воды (WUE _t) соответственно	Пять ядерных микросателлитных маркеров	Хотя генетическое разнообразие данного лесонасаждения было наполовину ниже такового в естественных популяциях, оно имело важное значение для сохранения этого эндемичного вида, учитывая его хороший многолетний рост и физиологию

Таблица 1. Продолжение

Популяция (публикация)	Дендрологические и другие данные	Генетические и геномные данные	Основные результаты
2203 дерева, представляющих участки с разными экологическими условиями, включая популяции на границе леса [85]	Ель канадская, или ель белая (<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss) Пространственные, климатические и дендрохронологические данные	11 ядерных микросателлитных маркеров	Обнаружено, что особенности микросреды в целом оказали большее влияние на показатели роста, чем генетическое сходство между отдельными деревьями; влияние климата на рост различалось между участками, но было меньше, чем влияние размера дерева; большая внутрииндивидуальная изменчивость ростовых реакций может свидетельствовать о высокой фенотипической пластичности ели белой, которая может амортизировать кратковременные изменения окружающей среды и, таким образом, позволяет выдерживать современные меняющиеся климатические условия
1473 дерева из 197 свободноопыляемых семей, представляющих 43 популяции [38]	Климатические (градиенты температуры, осадков и засушливости), 11 дендрометрических и связанных с засухой признаков (т.е. анатомические признаки, реакция роста и чувствительность к климату)	6153 снипа в 2606 генах-кандидатах; транскриптомные данные для 37 491 гена	285 генов были в значительной степени связаны с климатическими факторами или фенотипическими признаками, в том числе 110, которые дифференциально экспрессировались в ответ на засуху в контролируемых условиях теплицы; сеть фенотип-генов-оказывающих среда включала 8 генов, участвующих в адаптации ели к засухе, экспрессия четырех из которых была чувствительна к засухе
1540 деревьев – потомство от открытого опыления трех деревьев, выращенных и тестируемых на нескольких участках генетических испытаний по всей провинции Альберта (Канада) [41]	15 признаков, связанных с ростом, качеством древесины, засухоустойчивостью и чувствительностью, оцененных на основе данных дендрохронологии и годичных колец, а также уровень монотерпенов (как средство химической защиты от вредителей и фитопатогенов), отражающий стресс, вызванный засухой	467 224 снипа, генотипированных путем секвенирования (GBS) с использованием рестриктазы <i>EcoT22-I</i>	Отбор по высоте дерева, как правило, увеличивает диаметр и эффективность использования воды, но снижает плотность древесины, угол микрофибрилл и засухоустойчивость

Таблица 1. Окончание

Популяция (публикация)	Дендрологические и другие данные	Генетические и геномные данные	Основные результаты
19-летнее потомство 38 семейств полмикросс-гестирования в двух контрастных средах обитания в провинции Квебек, Канада (Québec, Canada) [42]	Возраст, ширина кольцевого прироста, преобразованная в приращение базальной площади (BAI), индивидуальные дендрофенотипы (Rt, Rs, Rc и RR), диаметр на высоте груди (DBH), высота дерева и акустические свойства	4091 снип, прогенотипированный с помощью Infinium iSelect SNP array	Деревья с более активным ростом в течение своей жизни были более устойчивы к засухе; точность прогнозирования фенотипов устойчивости с помощью геномной селекции (GBLUP) была сопоставима с традиционной селекцией (ABLUP)
Нотофагус Домбея (<i>Nothofagus dombeyi</i> (Mirb.) Blume)			
19 пар деревьев, одна со здоровой (НС), а другая с частично пораженной (РА) кроной на четырех участках в северной Патагонии, Аргентина, пострадавших от засухи [39]	Ширина кольцевого прироста, преобразованная в приращение базальной площади (BAI); дендрофенотипы, отражающие индивидуальную реакцию роста дерева на засуху (Rt, Rs, Rc и RR)	5224 снипа, генотипированных путем секвенирования (GBS) с использованием рестриктазы <i>ApeKI</i>	33 адаптивных SNP, дискриминирующих РА от НС деревьев, 8 из которых были связаны с водным стрессом, 6 с дендрофенотипами, и локализованных в генах, кодирующих такие важные белки как большая субъединица хлоропластной рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы, этилен-чувствительный транскрипционный фактор ERF062 и промотор-связывающий белок SPL
Нотофагус макрокарпа (<i>Nothofagus macrocarpa</i> (A.DC.) F.M. Vázquez & R.A. Rodr.)			
74 дерева в пяти популяциях из центрального региона Чили [40]	Дендрофенотипы, отражающие индивидуальную реакцию роста дерева на засуху (Rt, Rs, Rc и RR); размер дерева	Восемь ядерных микросателлитных маркеров	Различия по дендрофенотипам в основном объясняются влиянием размера деревьев и месторасположения, а не генетическим разнообразием; наблюдаемые различия в устойчивости деревьев к внешним воздействиям между участками можно объяснить значительной фенотипической пластичностью, обусловленной генетически разнообразными генофондами

* Проект РНФ № 19-14-00120 “Изучение генетической адаптации деревьев к стрессовым факторам на основе полногеномного и дендрохронологического анализа в контексте глобального изменения климата”.

подчеркивают необходимость и эффективность изучения дендрохронологических данных вместе с генетическими на индивидуальном уровне для понимания динамики роста природных популяций и их адаптивного потенциала.

Рост и репродукция деревьев

Корреляция между наблюдаемой индивидуальной гетерозиготностью деревьев, определенной в среднем по большому числу генетических маркеров со средней индивидуальной шириной годичных колец (average tree ring width – AvTRW – прокси гетерозиса), и ее дисперсией (variance of tree ring width – VarTRW – прокси гомеостаза) была изучена у лиственницы сибирской [27] и горной тсуги (*Tsuga mertensiana* Bong. Carr) [29], чтобы проверить гипотезу о том, что деревья с более высокой индивидуальной гетерозиготностью также будут иметь более высокий и устойчивый прирост, предполагая, что они могут быть более устойчивыми к климату и окружающей среде, в том числе в экстремальных условиях на границе альпийского леса. Результаты показали, что не было существенной связи между ростом дерева и индивидуальной гетерозиготностью. Однако между средней шириной годичных колец и дисперсией прироста годичных колец у горной тсуги наблюдалась значительная положительная взаимосвязь, подразумевающая, что в целом быстрорастущие деревья в стрессовых условиях, таких как альпийская линия деревьев, растут нестабильно независимо от уровня индивидуальной гетерозиготности.

Влияние дендрофенотипических, пространственных и климатических переменных на индивидуальный рост деревьев и их отцовский и материнский репродуктивный успех было изучено в пяти популяциях европейской ели с использованием полиморфных генетических маркеров для анализа семейной структуры, необходимой для оценки индивидуального репродуктивного успеха (табл. 1; [37]). Использованный в этой работе дендрогенетический подход позволил найти функциональные связи между индивидуальными экофизиологическими особенностями деревьев и их эволюционной и адаптивной значимостью.

Генетические механизмы устойчивости к стрессам

Поиск связей между изменчивостью генов и индивидуальной изменчивостью дендрофенотипов помогает понять генетические механизмы устойчивости к стрессам. В одном из первых дендрогенетических исследований использование совместно дендрохронологических и генетических данных для 233 деревьев сосны Веймута (*Pinus strobus* L.) позволило обнаружить ассоциации между изменчивостью дендрофенотипов, отражающих индивиду-

альную устойчивость к засухе, и изменчивостью ряда генов [33].

В исследовании [31] на выборке в 193 дерева европейской пихты (*Abies alba* Mill.) из Национального парка “Баварский лес” (Германия), переживших сильную засуху в 1976 г., была изучена связь между изменчивостью индивидуальных дендрофенотипов (индексов сопротивления Rt, устойчивости Rs и восстановления Rc) и изменчивостью 130 однонуклеотидных полиморфизмов (снийпов), прогенотипированных в 103 генах-кандидатах, чья функция предположительно связана также с ответом на различные стрессы. Было обнаружено 15 генов, включая гены фотосинтеза и устойчивости к засухе, чья изменчивость статистически достоверно коррелировала с изменчивостью дендрофенотипов.

Fasanella et al. [39] обнаружили шесть снийпов, чья изменчивость ассоциировалась с изменчивостью дендрофенотипов, отражающих индивидуальный ответ деревьев нотофагуса Домбея (*Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Blume) на засуху (табл. 1).

Приведенные примеры использования отражающих индивидуальный ответ деревьев на стресс дендрохронологических и дендрэкологических данных в ассоциативных генетических исследованиях демонстрируют новый эффективный подход для оценки устойчивости деревьев к средовым стрессам и для лучшего понимания генетических механизмов и функциональной адаптации лесных деревьев.

Полногеномный ассоциативный анализ и геномная селекция

Все более интенсивные и частые засухи, связанные с изменением климата, требуют от селекционеров рассматривать засухоустойчивость в качестве важнейшего селекционного признака в селекционных работах, а адаптацию к засухе — приоритетом в усилиях лесоводов по лесовосстановлению [41, 42, 87]. Такие сложные количественные признаки как засухоустойчивость контролируются множеством генов, соответственно селекция должна вестись одновременно по большому числу генов [88, 89]. Полногеномный ассоциативный анализ устойчивости к засухе путем поиска связи между устойчивыми дендрофенотипами и полногеномной генетической изменчивостью позволяет найти эти гены, чья изменчивость связана с засухоустойчивостью [31, 33, 35, 38, 39, 90, 91]. Например, значительные связи были обнаружены между 29 снийпами и признаками, связанными с засухой, качеством и влиянием климата на рост, в исследованиях 11 географических культур ели европейской в Австрии [35]. Эти связи объясняли от 11 до 43% изменчивости признаков. Большинство этих снийпов расположены

внутри экзонов генов, наиболее важные из которых экспрессируются преимущественно в тканях камбия и ксилемы. Данное исследование подтверждает высокую адаптивную изменчивость ели европейской в Центральной и Юго-Восточной Европе и демонстрирует как количественные генетические, дендроклиматические и геномные данные могут быть совместно использованы для понимания генетической основы адаптации деревьев к экстремальным климатическим условиям. Обнаруженные связи затем могут быть использованы в геномной селекции для предсказания устойчивых к засухе фенотипов на основе многолокусных генотипов [41, 42, 92] и в геномном редактировании [89, 93, 94].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный миниобзор демонстрирует, что использование данных дендрохронологии, дендрэкологии и дендроклиматологии совместно с генетическими данными позволяет более полно изучать структуру, динамику и адаптацию лесных древесных популяций. Индивидуальные дендрофенотипы отражают индивидуальный ответ деревьев на средовые факторы и стрессы и могут быть эффективно использованы для изучения генетических механизмов адаптации и лежащих в ее основе индивидуальных генов путем исследования ассоциаций изменчивости большого числа генов с изменчивостью дендрофенотипов. Исследования, проводимые в рамках описанной в данном миниобзоре новой интегративной дисциплины – дендрогеномики, позволяют более эффективно выявлять адаптивные генетические изменения в лесных популяциях. Знание их адаптационного потенциала крайне необходимо для прогнозирования последствий глобального изменения климата и разработки природоохранных и лесовосстановительных программ для смягчения его потенциального негативного воздействия.

Мы призываем к более широкому сотрудничеству дендрэкологов и лесных генетиков для изучения индивидуальных дендрофенотипов совместно с их генотипами, для поиска генетических ассоциаций важных адаптивных признаков с конкретными генами, которые их контролируют.

Автор выражает благодарность Д.Ф. Жирновой и Л.В. Белокопытовой (лаборатория дендрэкологии и экологического мониторинга Хакасского технического института – филиала СФУ, г. Абакан, Российская Федерация) и С.В. Новиковой и Н.В. Орешковой (лаборатория лесной геномики Сибирского федерального университета, г. Красноярск, Российская Федерация) за помощь в подготовке данного обзора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследова-

ний в рамках научных проектов № 19-14-00120 “Изучение генетической адаптации деревьев к стрессовым средовым факторам на основе полногеномного и дендрохронологического анализа в контексте глобального изменения климата” и № 22-14-00083 “Дендрогеномное изучение адаптации кедра сибирского в Западном Саяне к экстремальным средовым факторам”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Park A., Puettmann K., Wilson E. et al. Can boreal and temperate forest management be adapted to the uncertainties of 21st century climate change? // Crit. Rev. Plant Sci. 2014. V. 33. № 4. P. 251–285. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.858956>
2. Isaac-Renton M., Montwé D., Hamann A. et al. Northern forest tree populations are physiologically maladapted to drought // Nat. Commun. 2018. V. 9. № 5254. P. 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07701-0>
3. Sánchez-Pinillos M., D'Orangeville L., Boulanger Y. et al. Sequential droughts: A silent trigger of boreal forest mortality // Glob. Change Biol. 2022. V. 28. № 2. P. 542–556. <https://doi.org/10.1111/gcb.15913>
4. Kellomäki S. Management of boreal forests: Theories and applications for ecosystem services // Background: Management of Forest for Varying Ecosystem Services. Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2022. P. 1–9. https://doi.org/10.1007/978-3-030-88024-8_1
5. Tishkov A. Boreal forests // The Physical Geography of Northern Eurasia / Ed. Shahgedanova M. Oxford; N.Y.: Oxford Univ. Press, 2002. P. 217–233.
6. Prunier J., Verta J.-P., MacKay J.J. Conifer genomics and adaptation: at the crossroads of genetic diversity and genome function // New Phytol. 2016. V. 209. № 1. P. 44–62. <https://doi.org/10.1111/nph.13565>
7. Neale D.B., Wheeler N.C. The Conifers: Genomes, Variation and Evolution. Cham: Springer, 2019. 590 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46807-5>
8. Amaral J., Ribeyre Z., Vigneaud J. et al. Advances and promises of epigenetics for forest trees // Forests. 2020. V. 11. № 9:976. P. 1–21. <https://doi.org/10.3390/f11090976>
9. Vaganov E.A., Hughes M.K., Shashkin A.V. Growth Dynamics of Conifer Tree Rings: Images of Past and Future Environments. Berlin; Heidelberg; N.Y. USA: Springer-Verlag, 2006. 358 p. <https://doi.org/10.1007/3-540-31298-6>
10. Arzac A., Fonti A.V., Vaganov E.A. An overview on dendrochronology and quantitative wood anatomy studies

- of conifers in Southern Siberia (Russia) // Progress in Botany. Berlin; Heidelberg: Springer, 2021. P. 1–22. https://doi.org/10.1007/124_2021_52
11. *Fritts H.C., Vaganov E.A., Sviderskaya I.V., Shashkin A.V.* Climatic variation and tree-ring structure in conifers: Empirical and mechanistic models of tree-ring width, number of cells, cell size, cell-wall thickness and wood density // *Clim. Res.* 1991. V. 1. № 2. P. 97–116. <https://www.jstor.org/stable/24863301>
 12. *Fritts H.C.* Tree Rings and Climate. 2nd ed. Caldwell: The Blackburn Press, 2001. 567 p.
 13. *Wang T., Ren H., Ma K.* Climatic signals in tree ring of *Picea schrenkiana* along an altitudinal gradient in the central Tianshan Mountains, northwestern China // *Trees.* 2005. V. 19. № 6. P. 736–742. <https://doi.org/10.1007/s00468-005-0003-9>
 14. *Lloyd A.H., Bunn A.G.* Responses of the circumpolar boreal forest to 20th century climate variability // *Environ. Res. Lett.* 2007. V. 2. № 4:045013. P. 1–14. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/2/4/045013>
 15. *Cochran P.H.* Examples of mortality and reduced annual increments of white fir induced by drought, insects, and disease at different stand densities // USDA Forest Service, Pacific Northwest Experiment Station, Res. Note PNW-525. Portland, 1998. 19 p. <https://doi.org/10.2737/PNW-RN-525>
 16. *Speer J.H., Swetnam T.W., Wickman B.E., Youngblood A.* Changes in pandora moth outbreak dynamics during the past 622 years // *Ecology.* 2001. V. 82. P. 679–697. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2001\)082\[0679:CI-PMOD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[0679:CI-PMOD]2.0.CO;2)
 17. *Babushkina E.A., Zhirnova D.F., Belokopytova L.V et al.* Response of four tree species to changing climate in a moisture-limited area of South Siberia // *Forests.* 2019. V. 10. № 11:999. P. 1–18. <https://doi.org/10.3390/f10110999>
 18. *D'Arrigo R., Frank D., Pederson N. et al.* 1738 years of Mongolian temperature variability inferred from a tree-ring width chronology of Siberian pine // *Geophys. Res. Lett.* 2001. V. 28. № 3. P. 543–546. <https://doi.org/10.1029/2000GL011845>
 19. *Cooke B.J., Nealis V.G., Régnière J.* Insect defoliators as periodic disturbances in northern forest ecosystems // *Plant Disturbance Ecology*, 2nd ed. / Eds Johnson E.A., Miyanishi K. Amsterdam, The Netherlands: Acad. Press, 2020. P. 423–461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818813-2.00012-5>
 20. *Rozenberg P., Chauvin T., Escobar-Sandoval M. et al.* Climate warming differently affects *Larix decidua* ring formation at each end of a French Alps elevational gradient // *Ann. For. Sci.* 2020. V. 77. № 54. <https://doi.org/10.1007/s13595-020-00958-w>
 21. *Belokopytova L., Zhirnova D., Kostyakova T., Babushkina E.* Dynamics of moisture regime and its reconstruction from a tree-ring width chronology of *Pinus sylvestris* in the downstream basin of the Selenga River, Russia // *J. Arid Land.* 2018. V. 10. № 6. P. 877–891. <https://doi.org/10.1007/s40333-018-0025-y>
 22. *Belokopytova L.V., Zhirnova D.F., Meko D.M. et al.* Tree rings reveal the impact of soil temperature on larch growth in the forest-steppe of Siberia // *Forests.* 2021. V. 12. № 12:1765. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/f12121765>
 23. *Kostyakova T.V., Touchan R., Babushkina E.A., Belokopytova L.V.* Precipitation reconstruction for the Khakassia region, Siberia, from tree rings // *Holocene.* 2018. V. 28. № 3. P. 377–385. <https://doi.org/10.1177/0959683617729450>
 24. *Kostyakova T.V., Belokopytova L.V., Zhirnova D.F. et al.* Dendrochronological indication of phyllophages' outbreaks by larch radial growth in the forest-steppe zone of the Republic of Tyva // *Contemp. Probl. Ecol.* 2021. V. 14. № 1. P. 37–48. <https://doi.org/10.1134/S1995425521010054>
 25. *Demina A.V., Belokopytova L.V., Zhirnova D.F. et al.* Degree of connectivity in reconstructed precipitation dynamics and extremes for semiarid regions across South Siberia // *Dendrochronologia.* 2022. V. 71. № 125903. P. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2021.125903>
 26. *Demidko D.A., Sultson S.M., Mikhaylov P.V., Verkhovets S.V.* Influence of weather conditions and climate oscillations on the pine looper *Bupalus piniaria* (L.) outbreaks in the forest-steppe of the West Siberian Plain // *Forests.* 2022. V. 13. № 1:15. P. 1–18. <https://doi.org/10.3390/f13010015>
 27. *Babushkina E.A., Vaganov E.A., Grachev A.M. et al.* The effect of individual genetic heterozygosity on general homeostasis, heterosis and resilience in Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) using dendrochronology and microsatellite loci genotyping // *Dendrochronologia.* 2016. V. 38. P. 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2016.02.005>
 28. *Johnson J.S., Gaddis K.D., Cairns D.M., Krutovsky K.V.* Seed dispersal at alpine treeline: An assessment of seed movement within the alpine treeline ecotone // *Ecosphere.* 2017. V. 8. № 1: e01649. P. 1–15. <https://doi.org/10.1002/eecs2.1649>
 29. *Johnson J.S., Chhetri P., Krutovsky K.V., Cairns D.M.* Growth and its relationship to individual genetic diversity of mountain hemlock (*Tsuga mertensiana*) at alpine treeline in Alaska: combining dendrochronology and genomics // *Forests.* 2017. V. 8. № 11: 418. P. 1–15. <https://doi.org/10.3390/f8110418>
 30. *Johnson J.S., Krutovsky K.V., Rajora O.P. et al.* Advancing biogeography through population genomics // *Population Genomics: Concepts, Approaches and Applications* / Ed. Om Rajora. Cham: Springer, 2019. P. 539–585. https://doi.org/10.1007/13836_2018_39
 31. *Heer K., Behringer D., Piermattei A. et al.* Linking dendroecology and association genetics in natural populations: Stress responses archived in tree rings associate with SNP genotypes in silver fir (*Abies alba* Mill.) // *Mol. Eco.* 2018. V. 27. № 6. P. 1428–1438. <https://doi.org/10.1111/mec.14538>
 32. *Piotti A., Garbarino M., Avanzi C. et al.* Influence of spatiotemporal dynamics on the fine-scale spatial genetic structure of differently managed *Picea abies* stands // *Forests.* 2018. V. 9. № 10:622. <https://doi.org/10.3390/f9100622>
 33. *Housset J.M., Nadeau S., Isabel N. et al.* Tree rings provide a new class of phenotypes for genetic associations that foster insights into adaptation of conifers to climate

- change // *New Phytol.* 2018. V. 218. № 2. P. 630–645. <https://doi.org/10.1111/nph.14968>
34. *Evans M.E.K., Gugger P.F., Lynch A.M. et al.* Dendroecology meets genomics in the common garden: new insights into climate adaptation // *New Phytol.* 2018. V. 218. № 2. P. 401–403. <https://doi.org/10.1111/nph.15094>
 35. *Trujillo-Moya C., George J.-P., Fluch S. et al.* Drought sensitivity of Norway spruce at the species' warmest fringe: Quantitative and molecular analysis reveals high genetic variation among and within provenances // *G3: Genes Genom. Genet.* 2018. V. 8. № 4. P. 1225–1245. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300524>
 36. *Avanzi C., Piermattei A., Piotti A. et al.* Disentangling the effects of spatial proximity and genetic similarity on individual growth performances in Norway spruce natural populations // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 650. Part 1. P. 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.348>
 37. *Avanzi C., Heer K., Büntgen U. et al.* Individual reproductive success in Norway spruce natural populations depends on growth rate, age and sensitivity to temperature // *Heredity.* 2020. V. 124. P. 685–698. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0305-0>
 38. *Depardieu C., Gérardi S., Nadeau S. et al.* Connecting tree-ring phenotypes, genetic associations and transcriptomics to decipher the genomic architecture of drought adaptation in a widespread conifer // *Mol. Ecol.* 2021. V. 30. P. 3898–3917. <https://doi.org/10.1111/mec.15846>
 39. *Fasanella M., Suarez M.L., Hasbun R., Premoli A.C.* Individual-based dendroecological analysis of forest dieback driven by extreme droughts // *Can. J. For. Res.* 2021. V. 51. № 3. P. 420–432. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2020-0221>
 40. *Venegas-González A., Gibson-Capintero S., Anholetto-Junior C. et al.* Tree-ring analysis and genetic associations help to understand drought sensitivity in the Chilean endemic forest of *Nothofagus macrocarpa* // *Front. For. Glob. Change.* 2022. V. 5. № 762347. P. 1–13. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2022.762347>
 41. *Cappa E.P., Klutsch J.G., Sebastian-Azcona J. et al.* Integrating genomic information and productivity and climate-adaptability traits into a regional white spruce breeding program // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 3: e0264549. P. 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264549>
 42. *Laverdière J.-P., Lenz P., Nadeau S. et al.* Breeding for adaptation to climate change: Genomic selection for drought response in a white spruce multi-site polycross test // *Evol. Appl.* 2022. V. 15. № 3. P. 383–402. <https://doi.org/10.1111/eva.13348>
 43. *Lloret F., Keeling E.G., Sala A.* Components of tree resilience: effects of successive low-growth episodes in old ponderosa pine forests // *Oikos.* 2011. V. 120. № 12. P. 1909–1920. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19372.x>
 44. *Nikinmaa L., Lindner M., Cantarello E. et al.* Reviewing the use of resilience concepts in forest sciences // *Curr. For. Rep.* 2020. V. 6. № 2. P. 61–80. <https://doi.org/10.1007/s40725-020-00110-x>
 45. *Vicente-Serrano S.M., Quiring S.M., Peña-Gallardo M. et al.* A review of environmental droughts: Increased risk under global warming? // *Earth-Sci. Rev.* 2020. V. 201. № 102953. P. 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2019.102953>
 46. *Schwarz J., Skiadaresis G., Kohler M. et al.* Quantifying growth responses of trees to drought – a critique of commonly used resilience indices and recommendations for future studies // *Curr. For. Rep.* 2020. V. 6. № 3. P. 185–200. <https://doi.org/10.1007/s40725-020-00119-2>
 47. *Van Meerbeek K., Jucker T., Svenning J.-C.* Unifying the concepts of stability and resilience in ecology // *J. Ecol.* 2021. V. 109. № 9. P. 3114–3132. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13651>
 48. *Yi C., Jackson N.* A review of measuring ecosystem resilience to disturbance // *Environ. Res. Lett.* 2021. V. 16. № 5: 053008. P. 1–24. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/abdff09>
 49. *Castagneri D., Vacchiano G., Hacket-Pain A. et al.* Meta-analysis reveals different competition effects on tree growth resistance and resilience to drought // *Ecosystems.* 2022. V. 25. № 1. P. 30–43. <https://doi.org/10.1007/s10021-021-00638-4>
 50. *Pretzsch H., Río M., Giammarchi F. et al.* Changes of tree and stand growth: review and implications // *Climate-Smart Forestry in Mountain Regions. Managing Forest Ecosystems.* V. 40 / Eds Tognetti et al. Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2022. P. 189–222. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80767-2_6
 51. *Vilonen L., Ross M., Smith M.D.* What happens after drought ends: synthesizing terms and definitions // *New Phytol.* 2022. Online first. <https://doi.org/10.1111/nph.18137>
 52. *Zlobin I.E.* Linking the growth patterns of coniferous species with their performance under climate aridization // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 851. № 154971. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154971>
 53. *Haberstroh S., Werner C.* The role of species interactions for forest resilience to drought // *Plant Biol. J.* 2022. Online first. <https://doi.org/10.1111/plb.13415>
 54. *Hartmann H., Bastos A., Das A.J. et al.* Climate change risks to global forest health: Emergence of unexpected events of elevated tree mortality worldwide // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2022. V. 73. № 25. P. 1–30. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-012804>
 55. *Serra-Maluquer X., Mencuccini M., Martínez-Vilalta J.* Changes in tree resistance, recovery and resilience across three successive extreme droughts in the north-east Iberian Peninsula // *Oecologia.* 2018. V. 187. № 1. P. 343–354. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4118-2>
 56. *Van Mantgem P.J., Kerhoulas L.P., Sherriff R.L., Wenderott Z.J.* Tree-ring evidence of forest management moderating drought responses: Implications for dry, coniferous forests in the southwestern United States // *Front. For. Glob. Change.* 2020. V. 3. № 41. P. 1–7. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2020.00041>
 57. *Zhirnova D.F., Babushkina E.A., Belokopytova L.V., Vaganov E.A.* To which side are the scales swinging? Growth stability of Siberian larch under permanent moisture deficit with periodic droughts // *For. Ecol. Manag.* 2020. V. 459. № 1:117841. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117841>
 58. *Mihai G., Alexandru A.M., Stoica E., Birsan M.V.* Intra-specific growth response to drought of *Abies alba* in the

- Southeastern Carpathians // *Forests*. 2021. V. 12. № 4:387. P. 1–23.
<https://doi.org/10.3390/f12040387>
59. *Belokopytova L.V., Zhirnova D.F., Krutovsky K.V. et al.* Species- and age-specific growth reactions to extreme droughts of the keystone tree species across forest-steppe and sub-taiga habitats of South Siberia // *Forests*. 2022. (submitted)
 60. *Bohner T., Diez J.* Tree resistance and recovery from drought mediated by multiple abiotic and biotic processes across a large geographic gradient // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 789. № 147744. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147744>
 61. *Campôa J., Calvão T., Firmino P.N., Pimentel C.S.* Disentangling the effects of climate and defoliation on forest growth: The case of an outbreak of a *Thaumetopoea pityocampa* population with a shifted phenology in a *Pinus pinaster* monoculture // *For. Ecol. Manag.* 2021. V. 498. № 119548.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119548>
 62. *Weigandt M., Villacide J., Bianchi E. et al.* Growth response of *Pinus contorta* to the synergy of stress factors: Successive extreme drought events and a population outbreak of *Sirex noctilio* in NW Patagonia // *New Forests*. 2022. Online first.
<https://doi.org/10.1007/s11056-022-09907-z>
 63. *DeSoto L., Cailleret M., Sterck F. et al.* Low growth resilience to drought is related to future mortality risk in trees // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 545. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14300-5>
 64. *Mosca E., Cruz F., Gómez-Garrido J. et al.* A reference genome sequence for the European silver fir (*Abies alba* Mill.): A community-generated genomic resource // *G3: Genes Genom. Genet.* 2019. V. 9. № 7. P. 2039–2049.
<https://doi.org/10.1534/g3.119.400083>
 65. *Sun C., Xie Y.-H., Li Z. et al.* The *Larix kaempferi* genome reveals new insights into wood properties // *J. Integr. Plant Biol.* 2022. Online first.
<https://doi.org/10.1111/jipb.13265>
 66. *Niu S., Li J., Bo W. et al.* The Chinese pine genome and methylome unveil key features of conifer evolution // *Cell*. 2022. V. 185. № 1. P. 204–217.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.006>
 67. *Kuzmin D.A., Feranchuk S.I., Sharov V.V. et al.* Stepwise large genome assembly approach: A case of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb) // *BMC Bioinformatics*. 2019. V. 20 (Suppl. 1). № 37. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s12859-018-2570-y>
 68. *Белоконь М.М., Политов Д.В., Мудрик Е.А. и др.* Разработка микросателлитных маркеров сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) по результатам полногеномного *de novo* секвенирования // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 12. С. 1418–1427.
 69. *Орешкова Н.В., Путинцева Ю.А., Шаров В.В. и др.* Разработка микросателлитных маркеров лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на основе полногеномного *de novo* секвенирования // *Генетика*. 2017. Т. 53. № 11. С. 1278–1284.
<https://doi.org/10.7868/S0016675817110091>
 70. *Орешкова Н.В., Бондар Е.И., Путинцева Ю.А. и др.* Разработка ядерных микросателлитных маркеров с длинными (трех-, четырех-, пяти- и шестинуклеотидными) мотивами для трех видов лиственницы на основе полногеномного *de novo* секвенирования лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) // *Генетика*. 2019. Т. 55. № 4. С. 418–425.
 71. *Krutovsky K.V., Putintseva Y.A., Oreshkova N.V. et al.* Postgenomic technologies in practical forestry: Development of genome-wide markers for timber origin identification and other applications // *For. Eng. J.* 2019. V. 9. № 1. P. 9–16.
https://doi.org/10.12737/article_5c92016b64af27.15390296
 72. *Stevens K.A., Wegrzyn J.L., Zimin A. et al.* Sequence of the sugar pine megagenome // *Genetics*. 2016. V. 204. № 4. P. 1613–1626.
<https://doi.org/10.1534/genetics.116.193227>
 73. *Dasgupta M.G., Dharanishanthi V., Agarwal I., Krutovsky K.V.* Development of genetic markers in *Eucalyptus* species by target enrichment and exome sequencing // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 1: e0116528. P. 1–30.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116528>
 74. *Dasgupta M.G., Parveen A.B.M., Shanmugavel S. et al.* Targeted re-sequencing and genome-wide association analysis for wood property traits in breeding population of *Eucalyptus tereticornis* × *E. grandis* // *Genomics*. 2021. V. 113. № 6. P. 4276–4292.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.11.013>
 75. *Lu M., Krutovsky K.V., Nelson C.D. et al.* Exome genotyping, linkage disequilibrium and population structure in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. № 730. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3081-8>
 76. *Lu M., Krutovsky K.V., Nelson C.D. et al.* Association genetics of growth and adaptive traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) using whole exome-discovered polymorphisms // *Tree Genet. Genomes*. 2017. V. 13. № 3:57. P. 1–18.
<https://doi.org/10.1007/s11295-017-1140-1>
 77. *Parchman T.L., Jahner J.P., Uckele K.A. et al.* RADseq approaches and applications for forest tree genetics // *Tree Genet. Genomes*. 2018. V. 14. № 39. P. 1–25.
<https://doi.org/10.1007/s11295-018-1251-3>
 78. *Aguirre N.C., Filippi C.V., Zaina G. et al.* Optimizing ddRADseq in non-model species: A case study in *Eucalyptus dunnii* Maiden // *Agronomy*. 2019. V. 9. № 9:484. P. 1–21.
<https://doi.org/10.3390/agronomy9090484>
 79. *Jia K.-H., Zhao W., Maier P.A. et al.* Landscape genomics predicts climate change-related genetic offset for the widespread *Platycladus orientalis* (Cupressaceae) // *Evol. Appl.* 2020. V. 13. № 4. P. 666–677.
<https://doi.org/10.1111/eva.12891>
 80. *Ulaszewski B., Meger J., Burczyk J.* Comparative analysis of SNP Discovery and genotyping in *Fagus sylvatica* L. and *Quercus robur* L. using RADseq, GBS, and ddRAD methods // *Forests*. 2021. V. 12. № 2:222. P. 1–17.
<https://doi.org/10.3390/f12020222>
 81. *Varas-Myrik A., Sepúlveda-Espinoza F., Fajardo A. et al.* Predicting climate change-related genetic offset for the endangered southern South American conifer *Araucaria araucana* // *Forest Ecol. Management*. 2022. V. 504. № 119856.
 82. *Grace J., Berninger F., Nagy L.* Impacts of climate change on the tree line // *Ann. Bot.* 2002. V. 90. № 4. P. 537–544.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcf222>
 83. *Wang Y., Li D., Ren P. et al.* Heterogeneous responses of alpine treelines to climate warming across the Tibetan

- Plateau // *Forests*. 2022. V. 13. № 5:788. P. 1–13.
<https://doi.org/10.3390/f13050788>
84. Kruse S., Kolmogorov A.I., Pestyakova L.A., Herzsuh U. Long-lived larch clones may conserve adaptations that could restrict treeline migration in northern Siberia // *Ecol. Evol.* 2020. V. 10. № 18. P. 10017–10030.
<https://doi.org/10.1002/ece3.6660>
85. Zacharias M., Pampuch T., Heer K. et al. Population structure and the influence of microenvironment and genetic similarity on individual growth at Alaskan white spruce treelines // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 798. № 149267. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149267>
86. Santini F., Shestakova T.A., Dashevskaya S. et al. Dendroecological and genetic insights for future management of an old-planted forest of the endangered Mediterranean fir *Abies pinsapo* // *Dendrochronologia*. 2020. V. 63. № 125754. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.dendro.2020.125754>
87. Matallana-Ramirez L.P., Whetten R.W., Sanchez G.M., Payn K.G. Breeding for climate change resilience: A case study of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) in North America // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. № 606908. P. 1–22.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.606908>
88. Hu H., Xiong L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. V. 65. № 1. P. 715–741.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040000>
89. Singh P.K., Indoliya Y., Agrawal L. et al. Genomic and proteomic responses to drought stress and biotechnological interventions for enhanced drought tolerance in plants // *Curr. Plant Biol.* 2022. V. 29. № 100239. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2022.100239>
90. Wang H., Qin F. Genome-wide association study reveals natural variations contributing to drought resistance in crops // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. № 110. P. 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01110>
91. Pfenninger M., Reuss F., Kiebler A. et al. Genomic basis for drought resistance in European beech forests threatened by climate change // *eLife*. 2021. V. 10. № e65532. P. 1–17.
<https://doi.org/10.7554/eLife.65532>
92. Lebedev V.G., Lebedeva T.N., Chernodubov A.I., Shestibratov K.A. Genomic selection for forest tree improvement: methods, achievements and perspectives // *Forests*. 2020. V. 11. № 11:1190. P. 1–36.
<https://doi.org/10.3390/f11111190>
93. Joshi R.K., Bharat S.S., Mishra R. Engineering drought tolerance in plants through CRISPR/Cas genome editing // *3 Biotech*. 2020. V. 10. № 400. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02390-3>
94. Cao H.X., Vu G.T.H., Gailing O. From genome sequencing to CRISPR-based genome editing for climate-resilient forest trees // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 2:966. P. 1–26.
<https://doi.org/10.3390/ijms23020966>

Dendrogenomics – A New Interdisciplinary Field to Study Adaptive Genetic Potential of Forest Tree Populations by Integrating Dendrochronology, Dendroecology, Dendroclimatology and Genomics

K. V. Krutovsky^{a, b, c, d, *}

^aGeorg-August University of Göttingen, Göttingen, 37077 Germany

^bVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia

^cInstitute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041 Russia

^dMorozov Voronezh State University of Forestry and Technologies, Voronezh, 394087 Russia

*e-mail: kkrutovsky@gmail.com

This mini-review is devoted to dendrogenomics, a new interdisciplinary field of research that integrates dendrochronology, dendroecology, dendroclimatology, genetics and genomics and allows, based on a joint analysis of data obtained by dendrological and genomic methods, to explore important biological problems at a new level, in particular, such as the temporal dynamics of forest treelines, the spatial and temporal population structure, as well as to study the adaptive genetic potential of forest tree populations. These problems are especially relevant in the context of global warming, which contributes to the active advancement of forests to the north and higher mountain altitude, previously poorly adapted for woody plants, as well as to understand whether the observed level of adaptive genetic potential of forest tree populations is sufficient for their survival in new climatic conditions.

Keywords: adaptation, annual tree rings, conifers, dendrogenomics, dendrochronology, dendroclimatology, dendroecology, DNA sequencing, drought, fir, genetic associations, genomics, genomic selection, genome editing, GWAS, larch, pest outbreak, pine, spruce.

УДК 582.475.4:575.86

ДРЕВНЯЯ И СОВРЕМЕННАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ СИБИРСКОЙ КЕДРОВОЙ СОСНЫ И КЕДРОВОГО СТЛАНИКА НА ЮГЕ ЯКУТИИ

© 2022 г. М. М. Белоконь^{1, *}, Ю. С. Белоконь¹, Е. А. Петрова², Г. В. Васильева², А. П. Ефимова³, Е. С. Захаров^{3, 4}, С. Н. Горошкевич², Д. В. Политов¹¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия²Институт мониторинга климатических и экологических систем Сибирского отделения Российской академии наук, Томск, 634055 Россия³Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск, 677007 Россия⁴Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, 677980 Россия

*e-mail: belokon@vigg.ru

Поступила в редакцию 06.06.2022 г.

После доработки 20.06.2022 г.

Принята к публикации 21.06.2022 г.

С помощью анализа генотипов взрослых растений кедрового стланика, *Pinus pumila* (Pall.) Regel, и сибирской кедровой сосны, *Pinus sibirica* Du Tour, по аллозимам (ядерным кодоминантным маркерам с бипарентальным наследованием) и мтДНК исследована зона гибридизации на северной границе перекрывания ареалов на стыке Приленского плато со Становым и Алданским нагорьями. Получены доказательства современной гибридизации этих видов, а также прошлых гибридизационных событий. Наше исследование выявило, что в условиях Южной Якутии гибридизация проходит преимущественно однонаправленно с асимметричным потоком генов между видами. В большинстве изученных выборок из зоны симпатрии отмечается замена митохондриальных геномов *Pinus sibirica* геномами *Pinus pumila*. Данное явление может носить адаптивный характер и способствовать расширению ареала сибирской кедровой сосны.

Ключевые слова: сибирская кедровая сосна, *Pinus sibirica*, кедровый стланик, *Pinus pumila*, гибридизация, интрогрессия, аллозимы, *nad1* intron2.

DOI: 10.31857/S0016675822110029

Межвидовая гибридизация широко распространена среди высших растений, в том числе и древесных [1–3]. Отсутствие репродуктивных барьеров среди сосен в пределах подрода *Strobos* рода *Pinus* хорошо документировано [4, 5]. Гибридизационные события, по-видимому, имели значительное влияние на формирование современных видов сосен [6–9].

Сибирская кедровая сосна, *Pinus sibirica* Du Tour, занимает обширный ареал в таежном поясе от Приуралья, Урала и Западной Сибири до Забайкалья. Ареал кедрового стланика, *Pinus pumila* (Pall.) Regel, простирается от оз. Байкал на западе до Камчатки и Курильских островов на востоке. Стланик встречается в подгольцовом поясе высокогорий, в составе смешанных таежных древостоев на средних высотах, а также в низкогорьях. В Прибайкалье и Забайкалье расположена зона перекрывания ареалов и контакта этих видов (рис. 1). Места совместного произрастания кедровой сосны и стланика были обнаружены на во-

сточном побережье оз. Байкал (Баргузинский заповедник), в дельте Верхней Ангары, в Южном Забайкалье (гора Алханай, Могойтуйский хребет Хэнтэй-Чикойского нагорья), по всей горной системе Станового хребта до Алданского нагорья на крайнем северо-востоке зоны перекрывания ареалов [10–13]. В этих местах происходит естественная гибридизация с образованием гибридов в различных сочетаниях. Поскольку кедровая сосна и стланик представляют собой виды с контрастными экологическими особенностями, естественные гибриды первого поколения между ними можно идентифицировать морфологически по наличию нескольких невертикальных стволов, или ветвей, отходящих от основного ствола по стланиковому типу, а также по цвету созревающих женских шишек [12]. Однако такое определение не всегда является точным.

Первое генетическое доказательство межвидовой гибридизации было получено с применением аллозимных локусов [14, 15]. В дальнейшем были



Рис. 1. Локализация изученных выборок и ареалы *P. sibirica* и *P. pumila*.

изучены зоны гибридации в Баргузинском заповеднике, в дельте Верхней Ангары [10, 12], в Южном Забайкалье [13]. На северо-востоке зоны перекрывания ареалов (Алданское нагорье) при помощи маркеров хлоропластной и мтДНК изучены две локальности с совместным произрастанием видов [11]. Обнаружена однонаправленная интрогрессия митохондриальных геномов — все деревья сибирской кедровой сосны в гибридной зоне обладают мтДНК от кедрового стланика. У части особей (17%) выявлены хлоропластные геномы, которые были унаследованы от кедрового стланика или гибридов. Таким образом, в геномах всех деревьев, определенных морфологически как сибирская кедровая сосна, выявлены следы гибридации.

Задачей нашего исследования было изучение гибридации между сибирской кедровой сосной и кедровым стлаником на севере зоны перекрывания ареалов на стыке Приленского плато со Становым и Алданским нагорьями с применением аллозимов (ядерных кодоминантных маркеров с бипарентальным наследованием) и мтДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В Южной Якутии *P. sibirica* распространена на Приленском плато до северных отрогов Станового

и Алданского нагорья, по долинам рек, в составе таежных лесов на высотах 450–500 м над уровнем моря. *P. pumila* занимает высоты от 700 м над уровнем моря и выше, до подгольцового пояса. Места их совместного произрастания в составе смешанных древостоев встречаются довольно редко. Для данного исследования мы выбрали три популяции сосны кедровой сибирской в местах, где современные ареалы видов не перекрываются, две группы выборок из зоны симпатрии в Алданском районе Республики Саха (Якутия), представленные особями обоих видов и предполагаемыми гибридами, а также две популяции кедрового стланика за пределами этой зоны (табл. 1, рис. 1).

В качестве материала для генетического анализа использовали вегетативные почки. Для аллозимного анализа готовили гомогенаты с добавлением 0.5 М Трис-НСl буфера рН 7.5, содержащего 3% поливинилпирролидона и 0.2% β-меркаптоэтанола. Горизонтальный электрофорез экстрактов в 13%-ном крахмальном геле с последующим гистохимическим окрашиванием срезов для выявления зон активности ферментов проводили по описанным ранее методикам [14]. В анализ были включены 22 локуса, кодирующие 15 изоферментов: алкогольдегидрогеназу (ADH, 1.1.1.1), формилдегидрогеназу (FDH, 1.2.1.2), флуоресцентную эстеразу (FE, 3.1.1.1), глутаматдегидрогеназу (GDH,

Таблица 1. Расположение, фенотипическая видовая идентификация и численности изученных выборок кедровых сосен

Название выборки	Регион	Координаты	Сокращенное обозначение	Численность и видовая идентификация
Баталино	З. Сибирь, Томская область, Томский р-н, уроч. Баталино	56°14' с.ш. 84°32' в.д.	BatS	30 особей <i>P. sibirica</i> без признаков гибридности
Ленск	Респ. Саха (Якутия), Ленский р-н, окрестности г. Ленск	60°43' с.ш. 114°54' в.д.	LenS	26 особей <i>P. sibirica</i> без признаков гибридности
Олёкминск	Респ. Саха (Якутия), Олёкминский р-н, окрестности г. Олёкминск	60°23' с.ш. 120°26' в.д.	OleS	20 особей <i>P. sibirica</i> без признаков гибридности
Алдан	Респ. Саха (Якутия), Алданский район, 5 км от г. Алдан, окрестности пос. Ленинский	58°20' с.ш. 125°17' в.д.	AldS	56 особей <i>P. sibirica</i> без признаков гибридности
			AldH	15 особей, определенных как гибриды
			AldP	25 особей <i>P. pumila</i> без признаков гибридности
Алдан 2	Респ. Саха (Якутия), Алданский район, окрестности пос. Ленинский, вдоль дороги на Якокут	58°34' с.ш. 125°28' в.д.	Ald2S	41 особь <i>P. sibirica</i> , у одного дерева отмечены признаки гибридности
Алдан 3	Респ. Саха (Якутия), Алданский район, окрестности г. Алдан, Белая гора	58°27' с.ш. 125°25' в.д.	Ald3P	41 особь <i>P. pumila</i> без признаков гибридности
Томмот	Респ. Саха (Якутия), Алданский район, окрестности пос. Томмот	58°58' с.ш. 126°16' в.д.	TomS	45 особей <i>P. sibirica</i> , признаки гибридности отмечены у двух деревьев
			TomP	20 особей <i>P. pumila</i> без признаков гибридности
Каталах	Респ. Саха (Якутия), Алданский район, южнее п. Томмот	58°15' с.ш. 126°18' в.д.	KatP	30 особей <i>P. pumila</i> , признаки гибридности отмечены у одного дерева
Большое Токо	Респ. Саха (Якутия), Нерюнгринский р-н, окрестности оз. Большое Токо (Токко)	56°16' с.ш. 130°32' в.д.	BToP	34 особи <i>P. pumila</i> без признаков гибридности
Сегян-Кюёль	Центральная Якутия, Кобяйский улус, окрестности п. Сегян-Кюёль	64°00' с.ш. 130°18' в.д.	SegP	33 особи <i>Pinus pumila</i> без признаков гибридности

1.4.1.2-4), глутаматоксалоацетаттрансаминазу (GOT, 2.6.1.1), изоцитратдегидрогеназу (IDH, 1.1.1.42), лейцинаминопептидазу (LAP, 3.4.11.1), малатдегидрогеназу (MDH, 1.1.1.37), менадионредуктазу (MNR, 1.6.99.2), фосфоенолпируваткарбоксилазу (PEPСА, 4.1.1.31), фосфоглюкоизомеразу (PGI, 5.3.1.9), 6-фосфоглюконатдегидрогеназу (PGD, 1.1.1.44), фосфоглюкомутазу (PGM, 5.4.2.2), шикиматдегидрогеназу (SKDH, 1.1.1.25) и супероксиддисмутазу (SOD, 1.15.1.1).

Тотальную ДНК выделяли из тех же гомогенатов вегетативных почек с использованием СТАВ [16]. В качестве видоспецифичного митохондриального маркера использовали интрон 2 локуса NADH-дегидрогеназы-1 (*nad1* intron2), для которого описаны разные длины ампликонов у исследуе-

мых видов сосен [17]. Фрагмент *nad1* intron2 амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами [18] и ранее использованными условиями и режимами амплификации [11]. Амплифицированные фрагменты разделяли путем электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле в буфере ТАЕ (трис-ацетат-ЭДТА) [19].

Оценку байесовской апостериорной вероятности принадлежности к конкретному гибриднему классу (вид 1, вид 2, гибриды F1 и F2 и поколение обратного скрещивания с видом 1 или видом 2) по многолокусным аллозимным генотипам проводили в программе NewHybrids, версия 1.1_b3 [20] с использованием графического интерфейса и 300 000 повторов.

Таблица 2. Видовой состав изученных выборок и полиморфизм по длинам фрагмента *nad1* intron2 мтДНК

Выборка	<i>P. sibirica</i>	Гибриды	<i>P. pumila</i>	<i>nad1</i> intron2	
				<i>S</i>	<i>P</i>
Баталино	30	—	—	30	—
Ленск	26	—	—	26	—
Олёкминск	20	—	—	1	19
Алдан	56	15	25	—	96
Алдан 2	41	—	—	—	41
Алдан 3	—	—	41	—	41
Томмот	45	—	20	—	65
Каталах	—	1	29	—	30
Большое Токо	—	—	36	—	36
Сегян-Кюёль	—	—	33	—	33

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все образцы были генотипированы по 22 аллозимным локусам: *Adh-1*, *Fdh*, *Fe-2*, *Gdh*, *Got-1*, *Got-2*, *Got-3*, *Idh*, *Lap-3*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mnr-1*, *Pepca*, *6Pgd-2*, *6Pgd-3*, *Pgi-2*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Skdh-1*, *Skdh-2*, *Sod-1* и *Sod-2*. Максимальный вес для различения видов имеет *Skdh-2*, по этому локусу у *P. sibirica* и *P. pumila* фиксированы разные аллели. Аллельный состав остальных изученных локусов частично или полностью перекрывается. При этом локусы *Adh-1*, *Fe-2*, *Gdh*, *Got-2*, *Got-3*, *Lap-3*, *Mdh-2*, *Mnr-1*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Pepca*, *Skdh-1*, *Sod-1* и *Sod-2* также имеют высокий диагностический вес за счет различий в частотах преобладающих аллелей и наличия видоспецифичных аллелей. Результаты анализа многолокусных генотипов сибирской кедровой сосны, кедрового стланика и их предполагаемых гибридов в программе NewHybrids приведены на рис. 2.

Полиморфизм выборок по фрагменту *nad1* intron2 мтДНК (*P. sibirica*, *S* – 2530 пн; *P. pumila*, *P* – 2181 пн) представлен в табл. 2.

В выборке Баталино (BatS), Томская область, все особи сибирской кедровой сосны имеют типичный для вида фрагмент *nad1* intron2 мтДНК (2530 пн) и характерные генотипы по аллозимным локусам (рис. 2, табл. 2). Деревья *P. sibirica* из выборки Ленск (LenS) также не демонстрируют гибридности по генетическим маркерам. Среди 20 деревьев из выборки Олёкминск (OleS) у 19 выявлен типичный для стланика фрагмент *nad1* intron2 мтДНК (2181 пн). У одного дерева фрагмент *nad1* intron2 соответствует *P. sibirica*. При этом генотипы по аллозимным локусам у всех деревьев характерны для сибирской кедровой сосны.

В зоне симпатрии *P. sibirica* и *P. pumila* в окрестностях г. Алдан было выделено несколько выборок различающегося видового состава (табл. 1). Среди 56 деревьев сибирской кедровой сосны из

выборки Алдан (AldS) по изоферментным данным пять особей несли следы гибридизации (рис. 2): две особи определены как гибриды F1; одно дерево – бэкросс на *P. sibirica*; два дерева несли следы более отдаленной гибридизации – вероятные вторичные и более отдаленные бэкроссы на *P. sibirica*. Из 15 образцов, определенных по морфологии как гибриды (AldH), шесть оказались гибридами F1, один – бэкроссом на стланик, у которого в предках был гибрид, восемь особей генетически не отличались от кедрового стланика. В группе из 25 растений кедрового стланика (AldP) только у одного выявлены вероятные следы гибридизации в третьем поколении. Остальные особи не демонстрируют признаков гибридности.

Выборка Ald2S из смешанного насаждения с незначительным присутствием кедрового стланика состояла из 41 дерева сосны кедровой сибирской без фенотипических признаков гибридности. Только у одного дерева были отмечены несколько ветвей, отходящих от ствола по стланиковому типу. Все особи имеют типичный для стланика фрагмент *nad1* intron2 мтДНК и характерные для сибирской кедровой сосны генотипы по аллозимным локусам.

Выборка Ald3P из смешанного насаждения без присутствия *P. sibirica* состояла из 41 особи кедрового стланика без признаков гибридности. Генетический анализ выявил у всех растений фрагмент *nad1* intron2, соответствующий стланику, а также типичные для стланика аллозимные генотипы.

В выборке Томмот (TomS) из 45 деревьев сибирской кедровой сосны 44 не демонстрировали признаков гибридизации по изоферментам, но при этом длина фрагмента *nad1* intron2 у всех особей соответствовала *P. pumila*. Генотип одного дерева по аллозимным локусам был отнесен с высокой вероятностью к гибриду F1 с небольшой примесью бэкросса на кедровую сосну. У 20 образцов

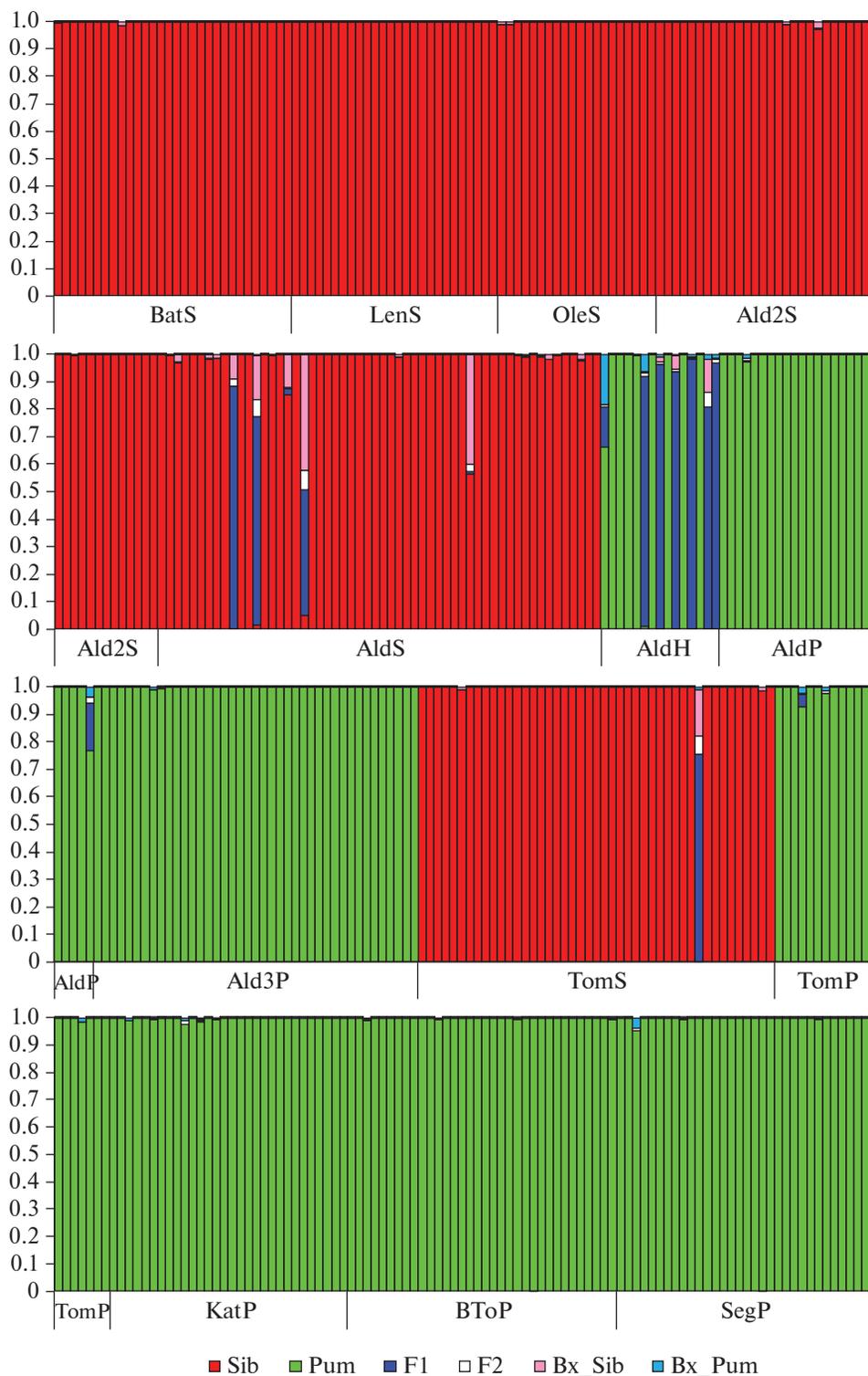


Рис. 2. Значения апостериорной вероятности принадлежности особи к гибриднему классу.

стланика (TomP) генетических следов гибридизации не обнаружено.

Все 30 особей кедрового стланика из выборки Каталах (KatP) и по аллозимным генотипам, и по

мтДНК оказались типичными *P. pumila* без следов гибридизации. Две выборки *P. pumila* из зоны аллопатрии – Большое Токо (BToP) и Сегян-Кюэль (SegP) представлены растениями с типичными для стланика генотипами.

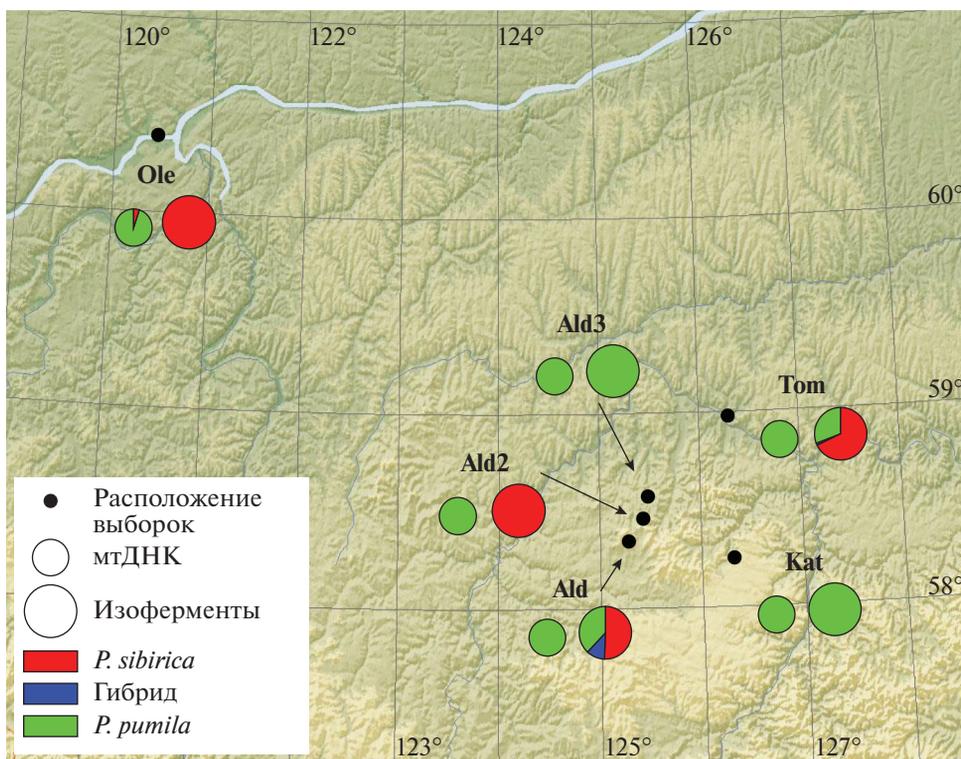


Рис. 3. Состав изученных выборок из зоны гибридизации по результатам анализа мтДНК и изоферментов.

Таким образом, среди деревьев, относимых по габитусу к сибирской кедровой сосне, по всей северной границе зоны перекрывания ареалов от Олёкминска до Томмота наблюдается практически полная замена мтДНК кедровой сосны на мтДНК стланика (рис. 3). При этом в большинстве выборок аллозимные генотипы *P. sibirica* соответствуют типичным для вида.

В Алданском районе гибридные по морфологическим признакам растения были обнаружены только в двух локальностях с совместным произрастанием *P. sibirica* и *P. pumila* – Ald и Tom. Оказалось, что в генотипах некоторых из них нет следов гибридизации и они могут быть отнесены к кедровому стланику. Среди деревьев сибирской кедровой сосны шесть оказались гибридами, причем три из них могут быть отнесены к F1. В генотипах растений *P. pumila* следов гибридизации практически не обнаружено, за исключением одного отдаленного гибрида из выборки Ald.

ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимыми условиями для гибридизации двух видов являются формирование зон контакта и перекрывания ареалов, отсутствие репродуктивных барьеров, совпадение сроков репродукции. Сходная морфология пыльцы у *P. sibirica* и *P. pumila* делает взаимное опыление возможным

[21]. Необходимым условием для переопыления является хотя бы частичное перекрывание сроков цветения видов в смешанных популяциях. Как показали наблюдения, в зонах гибридизации вокруг оз. Байкал такое перекрывание возможно в пределах 12 дней, в то время как продолжительность цветения каждого из видов составляет 15 дней [9, 22]. Сроки созревания микростробилов и женских шишек у гибридных растений промежуточные между кедровой сосной и стлаником [23].

Кроме перекрывания фенофаз цветения на структуру гибридных популяций влияет численное соотношение особей родительских видов и гибридов в составе насаждения. Исследование происхождения зародышей семян от свободного опыления на побережье оз. Байкал (Давша, Баргузинский заповедник) установило, что в структуре опыления ведущая роль принадлежит *P. sibirica* – виду с преобладающей численностью, который опыляет и *P. pumila*, и гибриды. Также была подтверждена гипотеза о том, что гибриды первого поколения могут участвовать в опылении, давая начало как бэкроссам, так и гибридам второго поколения [24]. На основании анализа *nad1 intron2* было показано, что в смешанных популяциях на побережье Байкала, где большинство гибридных растений являются гибридами F1, в роли материнских растений преимущественно выступает вид с более высокой численностью в данном насажде-

нии [25]. У 15 из 16 гибридов из дельты Верхней Ангары, где в насаждении преобладает *P. pumila*, мтДНК оказалась от стланика. В выборке из Баргузинского заповедника мтДНК гибридов была преимущественно от *P. sibirica* (у 21 гибрида из 22), несмотря на то, что пыльца кедрового стланика в данной локальности не играет заметной роли в структуре опыления [26].

Изучение семенной продуктивности гибридов показало, что они отличаются значительно более высокой долей недоразвитых и пустых семян по сравнению с чистыми видами [22, 26]. Тем не менее в результате экспериментов по искусственному опылению чистых видов и их гибридов в условиях стационара было установлено, что наибольшее количество полноценных семян формируется в случае опыления материнских растений одного из родительских видов пыльцой гибрида. Обратные сочетания с опылением гибридных растений чистыми видами дают меньше полных семян. Наиболее низкая продуктивность отмечена при опылении гибрида пыльцой *P. sibirica* [27].

Наше исследование выявило преимущественно однонаправленную гибридизацию с асимметричным потоком генов между видами в условиях Южной Якутии. Данные мтДНК указывают на то, что в процессе гибридизации материнскими растениями выступали особи кедрового стланика, которые опылялись пыльцой сибирской кедровой сосны. Затем гибридные растения также могли опыляться пыльцой сибирской кедровой сосны и далее до возникновения ситуации, когда большая часть ядерных генов оказывалась постепенно замещенной генами *P. sibirica*. Такой процесс довольно протяжен во времени и предусматривает на начальном этапе значительный перевес численности растений *P. pumila* (материнский вид) над *P. sibirica*. Возможно, что среди потомства гибридов F1 селективное преимущество получали бэккроссы от опыления кедровой сосной. Можно предположить, что *P. pumila* имела большее распространение на юге Приленского плато, но в дальнейшем из-за изменений климатических и экологических условий была оттеснена в более высотные местообитания. Поскольку крайняя восточная точка нахождения единичной особи *P. sibirica* с характерной для кедровой сосны мтДНК — Олёкминск, можно заключить, что продвижение вида с запада на восток происходило довольно длительное время и исключительно за счет однонаправленной гибридизации.

В зоне контакта видов в Алданском районе Республики Саха происходит современная гибридизация, в которой участвуют кедровый стланик с типичными для него генотипами как по ядерным маркерам, так и по мтДНК, и сибирская кедровая сосна с характерными для вида ядерными маркерами, но с мтДНК от стланика. Наши изофер-

ментные данные являются первыми результатами анализа локусов ядерного генома симпатричных кедровых сосен в данном регионе, они подтверждают наличие гибридов F1 и бэккроссов различного направления, что также соответствует ранее полученным данным по хпДНК [11].

В горных местообитаниях на островах Хонсю и Хоккайдо (Япония) кедровый стланик обитает в контакте с сосной мелкоцветковой, *P. parviflora* var. *pentaphylla*, что приводит к их гибридизации [28, 29], при этом в ряде локальностей происходит однонаправленная интрогрессия митохондриальных геномов от *P. pumila* к *P. parviflora* var. *pentaphylla*. С возрастом высоты над уровнем моря увеличивается численность гибридных особей с мтДНК от стланика, при этом хпДНК интрогрессирует в обратном направлении [29, 30]. Авторы предположили, что такая структура зоны гибридизации связана с различиями в распространении пыльцы и семян. Как известно, у большинства хвойных хпДНК наследуется по отцовской линии и переносится с пыльцой, а мтДНК — по материнской и распространяется с семенами [31]. В трех зонах совместного произрастания на о. Хонсю обнаружена широкая интрогрессия мтДНК *P. pumila* к *P. parviflora* var. *pentaphylla* — почти все особи, по морфологии относимые к *P. parviflora* или к гибридам, обладали мтДНК от стланика, при этом хпДНК у них встречалась в разных сочетаниях [32].

Еще одним примером асимметричной интрогрессии цитоплазматических геномов могут служить североамериканские сосны — *P. contorta* и *P. banksiana* [33]. Характерный для *P. contorta* митотип встречается довольно далеко в зоне аллопатрии *P. banksiana*. По-видимому, это оказалось результатом древних гибридизационных событий. В зоне современного контакта и гибридизации этих видов распределение хлоротипов зависит от структуры популяции. Численное преимущество особей одного или другого вида определяет преобладающий тип хпДНК у гибридных растений.

С одной стороны, появление популяций сибирской кедровой сосны с мтДНК кедрового стланика можно трактовать лишь как результат механической однонаправленной интрогрессии, модерируемой неразвитыми механизмами презиготической изоляции, что характерно для видов хвойных в пределах родов, консерватизмом геномной организации из-за низких скоростей эволюции [34], а также перекрыванием фаз мужского и женского “цветения” [35]. То есть замещение мтДНК можно трактовать как селективно нейтральный процесс, связанный лишь с межвидовым потоком генов, возникающим как следствие репродуктивных особенностей видов. Но с другой стороны, учитывая экстремальные для *P. sibirica* условия существования на северо-восточной гра-

нице его ареала, захват митохондрий другого вида и закрепление чужеродных митотипов может быть также и следствием адаптивных процессов. В последние годы активно обсуждается роль так называемой адаптивной интрогрессии [36]. Интрогрессия митохондриального субгенома кедрового стланика, который содержит у растений десятки генов [37], контролирующих в том числе энергетический обмен, привела к полному замещению мтДНК сибирской кедровой сосны на мтДНК *P. pumila*. Этот быстрый в эволюционном масштабе времени процесс (по сравнению с “дарвиновской” эволюцией, основанной на случайных мутациях и поддержке естественным отбором той ничтожной доли из них, которая может нести положительный селективный потенциал) мог стать полезной адаптацией, обеспечившей существование вида на самом северо-востоке ареала, на территории, где условия сильно отличаются от зоны оптимума вида [38].

В отличие от модели постепенного формирования изоляции двух видов, которая проходит стадию гибридизации через поток генов между еще недостаточно сильно дивергировавшими исходными формами, в случае данной пары видов кедровых сосен мы имеем дело с сильно разошедшимися видами, имеющими глубокие различия как в морфологии и экологии, так и в ядерном геноме, и в органельных субгеномах [7]. По всей видимости, формирование этих видов проходило миллионы лет назад в разных рефугиумах, с накоплением существенных геномных различий, обуславливающих разные паттерны адаптации, и нынешние гибридизационные процессы не имеют прямого отношения к той фазе первичного обмена генами. Вторичная зона симпатрии в данном случае не привела к формированию такой широкой зоны интерградации фенотипических признаков и генотипической структуры, как это можно наблюдать для видов палеарктических елей [39–42] и лиственниц [43, 44]. В целом в пределах зоны симпатрии, в том числе и в рассматриваемом регионе Южной Якутии, *P. sibirica* и *P. pumila* ведут себя как хорошие виды. Гибриды постоянно образуются в биотопах, где виды находятся в условиях непосредственного контакта, но нигде особи с промежуточными фенологическими характеристиками и генотипами по генным локусам ядерной локализации не доминируют, не вытесняют исходные виды. В данном случае мы наблюдаем скорее не единую сплошную гибридную зону, а отдельные локальные зоны и очаги гибридизации, которая может идти далее первого–второго поколения [13], но при этом нигде не приводит к смешению видов. Захват чужеродной мтДНК, видимо, является альтернативной стратегией регуляции межвидового потока генов, которая позволяет избежать формирования плохо коадаптированных комплексов ядерных генов (гибридный дисгенез,

регуляторная несовместимость) [45], но в то же время дает возможность однонаправленного, а потенциально и взаимного, обогащения генетической структуры, примерами чему могут служить не только растения, но и некоторые группы животных [46].

Несовпадающие границы ареалов в зонах контактов близких видов по разным маркерам — ядерным, митохондриальным и хлоропластным неоднократно описывались для хвойных разных регионов Палеарктики, в частности для пихт [47, 48], лиственниц [43], елей [49–51]. Наблюдаемое нами явление имеет большое значение для практической видовой идентификации особей кедровых сосен в зонах симпатрии, поскольку в зависимости от используемого класса молекулярно-генетических маркеров одно и то же растение может быть признано представителем одного из родительских видов или их гибридом. В то же время пространственные границы распространения различных элементов органельных и ядерных геномов кедровых сосен требуют более детального изучения методами геномики.

Работа выполнена при финансовой поддержке по теме Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН № 0112-2019-0001 и по теме Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации проект № FWGR-2021-0007.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arnold M.L. Natural Hybridization and Evolution. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1997. 215 p.
2. Barton N.H., Hewitt G.M. Analysis of hybrid zones // Annual Rev. Ecol. and Systematics. 1985. V. 16. P. 113–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.000553>
3. Коропачинский И.Ю., Милютин Л.И. Естественная гибридизация древесных растений. Новосибирск: “Гео”, 2006. 233 с.
4. Critchfield W.B. Hybridization and classification of the white pines (*Pinus* section *Strobus*) // Taxon. 1986. V. 35. № 4. P. 647–656. <https://doi.org/10.2307/1221606>
5. Vasilieva G.V., Goroshkevich S.N. Artificial crosses and hybridization frequency in five-needle pines // Dendrobiology. 2018. V. 80. P. 123–130. <https://doi.org/10.12657/denbio.080.012>

6. *Syring J., Farrell K., Businsky R. et al.* Widespread genealogical nonmonophyly in species of *Pinus* subgenus *Strobus* // *Systematic Biology*. 2007. V. 56(2). P. 163–181.
<https://doi.org/10.1080/10635150701258787>
7. *Tsutsui K., Suwa A., Sawada K. et al.* Incongruence among mitochondrial, chloroplast and nuclear gene trees in *Pinus* subgenus *Strobus* (Pinaceae) // *J. Plant Research*. 2009. V. 122. P. 509–521.
<https://doi.org/10.1007/s10265-009-0246-4>
8. *Wang B., Wang X.-R.* Mitochondrial DNA capture and divergence in *Pinus* provide new insights into the evolution of the genus // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2014. V. 80. P. 20–30.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.07.014>
9. *Горошкевич С.Н., Петрова Е.А., Васильева Г.В. и др.* Межвидовая гибридизация как фактор сетчатой эволюции 5-хвойных сосен Северной и Восточной Азии // *Хвойные бореальной зоны*. 2010. Т. XXVII. № 1–2. С. 50–57.
10. *Goroshkevich S.N.* Natural hybridization between Russian stone pine (*Pinus sibirica*) and Japanese stone pine (*Pinus pumila*) // *Breeding and Genetic Resources of Five-needle Pines: Growth, Adaptability, and Pest Resistance*. IUFRO Working Party 2.02.15. Proc. RMRS-P-32. Medford: Fort Collins, U.S. Forest Service, 2004. P. 169–171.
11. *Petrova E.A., Zhuk E.A., Popov A.G. et al.* Asymmetric introgression between *Pinus sibirica* and *Pinus pumila* in the Aldan plateau (Eastern Siberia) // *Silvae Genetica*. 2018. V. 67. P. 66–71.
<https://doi.org/10.2478/sg-2018-0009>
12. *Горошкевич С.Н.* О возможности естественной гибридизации *Pinus sibirica* и *Pinus pumila* в Прибайкалье // *Бот. журн.* 1999. Т. 84. № 9. С. 48–57.
13. *Петрова Е.А., Горошкевич С.Н., Белоконов М.М. и др.* Естественная гибридизация кедрового стланика (*Pinus sibirica* Du Tour) и кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pallas) Regel) в южном Забайкалье // *Хвойные бореальной зоны*. 2012. Т. XXX. № 1–2. С. 152–156.
14. *Politov D.V., Belokon M.M., Maluchenko O.P. et al.* Genetic evidence of natural hybridization between Siberian stone pine, *Pinus sibirica* Du Tour, and dwarf Siberian stone pine, *P. pumila* (Pall.) Regel // *Forest Genetics*. 1999. V. 6. № 1. P. 41–48.
15. *Политов Д.В., Белоконов М.М., Малюченко О.П. и др.* Генетические доказательства естественной гибридизации между сибирской кедровой сосной *Pinus sibirica* и кедровым стлаником *Pinus pumila* (Pinaceae) // *Проблемы ботаники на рубеже XX–XXI веков: Тез. докл., представленных II (X) съезду Русского бот. об-ва, 26–29 мая 1998 г.* Санкт-Петербург, 1998. С. 180.
16. *Doyle J.J., Doyle J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. 1990. V. 12. P. 12–15.
17. *Gugerli F., Senn J., Anzidei M. et al.* Chloroplast microsatellites and mitochondrial *nad1* intron 2 sequences indicate congruent phylogenetic relationships among Swiss stone pine (*Pinus cembra*), Siberian stone pine (*Pinus sibirica*), and Siberian dwarf pine (*Pinus pumila*) // *Mol. Ecol.* 2001. V. 10. P. 1489–1497.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01285.x>
18. *Demesure B., Sodzi M., Petit R.J.* A set of universals primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants // *Mol. Ecol.* 1995. V. 4. P. 129–131.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1995.tb00201.x>
19. *Sambrook J., Fritsch E.R., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
20. *Anderson E.C., Thompson E.A.* A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data // *Genetics*. 2002. V. 160. P. 1217–1229.
<https://doi.org/10.1093/genetics/160.3.1217>
21. *Куприянова Л.А., Литвинцева М.В.* Группа *Cembra* рода *Pinus*, ее объем и связи по палинологическим данным // *Бот. журн.* 1974. Т. 59. № 5. С. 630–644.
22. *Goroshkevich S.N., Popov A.G., Vasilyeva G.V.* Ecological and morphological studies in the hybrid zone between *Pinus sibirica* and *Pinus pumila* // *Annals Forest Res.* 2008. V. 51. P. 43–52.
<https://doi.org/10.15287/afr.2008.144>
23. *Васильева Г.В., Жук Е.А., Понов А.Г.* Фенология цветения кедрового стланика (*Pinus sibirica* Du Tour), кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) и гибридов между ними // *Вестник Томского гос. ун-та. Биология*. 2010. № 1(9). С. 61–67.
24. *Petrova E.A., Goroshkevich S.N., Politov D.V. et al.* Population genetic structure and mating system in the hybrid zone between *Pinus sibirica* Du Tour and *Pinus pumila* (Pall.) Regel at the Eastern Baikal Lake shore // *Annals Forest Res.* 2008. V. 51. P. 19–30.
<https://doi.org/10.15287/afr.2008.142>
25. *Белоконов С.Ю., Петрова Е.А., Белоконов Ю.С., Белоконов М.М.* Анализ происхождения межвидовых гибридов сибирского кедрового стланика и кедрового стланика из Прибайкалья // *Леса Евразии – Подмосковные вечера: Материалы X междунар. конф. молодых ученых, посвященной 90-летию со дня основания Московского гос. ун-та леса и 170-летию со дня рождения профессора М.К. Турского*. М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2010. С. 168–170.
26. *Петрова Е.А., Горошкевич С.Н., Политов Д.В. и др.* Семенная продуктивность и генетическая структура популяций в зоне естественной гибридизации кедрового стланика и кедрового стланика в северном Прибайкалье // *Хвойные бореальной зоны*. 2007. Т. XXIV. № 2–3. С. 329–335.
27. *Vasilyeva G.V., Goroshkevich S.N.* Crossability of *Pinus sibirica* and *P. pumila* with their hybrids // *Silvae Genetica*. 2013. V. 62. № 1–2. P. 61–67.
<https://doi.org/10.1515/sg-2013-0008>
28. *Watano Y., Imazu M., Shimizu T.* Chloroplast DNA typing by PCR-SSCP in the *Pinus pumila* – *P. parviflora* var. *pentaphylla* complex (Pinaceae) // *J. Plant Research*. 1995. V. 108. P. 493–499.

29. *Watano Y., Imazu M., Shimizu T.* Spatial distribution of cpDNA and mtDNA haplotypes in a hybrid zone between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) // *J. Plant Research*. 1996. V. 109. P. 403–408.
<https://doi.org/10.1007/BF02344555>
30. *Watano Y., Kanai A., Tani N.* Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) revealed by molecular hybrid index analysis // *Am. J. Botany*. 2004. V. 91. № 1. P. 65–72.
<https://doi.org/10.3732/ajb.91.1.65>
31. *Neale D.B., Sederoff R.R.* Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine // *Theor. Appl. Genet.* 1989. V. 77. P. 212–216.
<https://doi.org/10.1007/BF00266189>
32. *Senjo M., Kimura K., Watano Y. et al.* Extensive mitochondrial introgression from *Pinus pumila* to *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) // *J. Plant Research*. 1999. V. 112. P. 97–105.
33. *Godbout J., Yeh F.C., Bousquet J.* Large-scale asymmetric introgression of cytoplasmic DNA reveals Holocene range displacement in a North American boreal pine complex // *Ecol. Evol.* 2012. V. 2. № 8. P. 1853–1866.
34. *Buschiazzo E., Ritland C., Bohlmann J., Ritland K.* Slow but not low: Genomic comparisons reveal slower evolutionary rate and higher dN/dS in conifers compared to angiosperms // *BMC Evolutionary Biology*. 2012. V. 12. № 8. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-8>
35. *Горошкевич С.Н., Петрова Е.А., Политов Д.В. и др.* Эколого-географическая дифференциация и интеграционные процессы в группе близкородственных видов с трансконтинентальным ареалом (на примере 5-хвойных сосен северной и восточной Азии) // *Хвойные бореальной зоны*. 2007. Т. XXIV. № 2–3. С. 167–173.
36. *Edelman N.B., Mallet J.* Prevalence and adaptive impact of introgression // *Annual Review Genet.* 2021. V. 55. P. 265–283.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-021821-020805>
37. *Hipkins V.D., Krutovskii K.V., Strauss S.H.* Organellar genomes in conifers: structure, evolution and diversity // *Forest Genetics*. 1994. V. 1. № 4. P. 179–189.
38. Кедровые леса Сибири. Новосибирск: Наука, 1985. 258 с.
39. *Боброев Е.Г.* Лесообразующие хвойные СССР. Л.: Наука, 1978. 188 с.
40. *Правдин Л.Ф.* Ель европейская и ель сибирская в СССР. М.: Наука, 1975. 176 с.
41. *Политов Д.В., Крутовский К.В.* Клинальная изменчивость и интрогрессивная гибридизация в популяциях европейской и сибирской елей // *Жизнь популяций в гетерогенной среде*. Йошкар-Ола, 1998. С. 78–89.
42. *Krutovskii K.V., Bergmann F.* Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci // *Heredity*. 1995. V. 74. P. 464–480.
43. *Semerikov V.L., Lascoux M.* Nuclear and cytoplasmic variation within and between Eurasian *Larix* (Pinaceae) species // *Am. J. Botany*. 2003. V. 90. № 8. P. 1113–1123.
<https://doi.org/10.3732/ajb.90.8.1113>
44. *Semerikov V.L., Semerikov L.F., Lascoux M.* Intra- and interspecific allozyme variability in Eurasian *Larix* Mill. species // *Heredity*. 1999. V. 82. P. 193–204.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1999.00471.x>
45. *Landry C.R., Hartl D.L., Ranz J.M.* Genome clashes in hybrids: insights from gene expression // *Heredity*. 2007. V. 99. № 5. P. 483–493.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801045>
46. *Walsh J., Kovach A.I., Olsen B.J. et al.* Bidirectional adaptive introgression between two ecologically divergent sparrow species // *Evolution*. 2018. V. 72. P. 2076–2089.
<https://doi.org/10.1111/evo.13581>
47. *Semerikova S.A., Khrunyk Y.Y., Lascoux M., Semerikov V.L.* From America to Eurasia: A multigenomes history of the genus *Abies* // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018. V. 125. P. 14–28.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.03.009>
48. *Semerikova S.A., Semerikov V.L., Lascoux M.* Post-glacial history and introgression in *Abies* (Pinaceae) species of the Russian Far East inferred from both nuclear and cytoplasmic markers // *J. Biogeography*. 2011. V. 38. № 2. P. 326–340.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02394.x>
49. *Tsuda Y., Chen J., Stocks M. et al.* The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*Picea abies*): cryptic refugia as stepping stones to the west? // *Mol. Ecol.* 2016. V. 25. № 12. P. 2773–2789.
<https://doi.org/10.1111/mec.13654>
50. *Мудрик Е.А., Полякова Т.А., Шатохина А.В. и др.* К вопросу о границе распространения североамериканских и сибирских гаплотипов *nad1* мтДНК у елей комплекса *Picea abies* – *P. obovata* в Западной Сибири // *Генетика популяций: прогресс и перспективы*. Материалы Междунар. науч. конф., посвященной 80-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова (1936–2006) и 45-летию основания лаборатории популяционной генетики им. Ю.П. Алтухова ИОГен РАН (17–21 апреля 2017 г., Звенигородская биологическая станция им. С.Н. Скадовского Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова). М.: Ваш Формат, 2017. С. 178–179.
51. *Мудрик Е.А., Полякова Т.А., Шатохина А.В. и др.* Пространственное распределение гаплотипов второго интрона гена *nad1* в популяциях ели комплекса европейской и сибирской елей (*Picea abies* – *P. obovata*) // *Генетика*. 2015. Т. 51. № 10. С. 1117–1125.
<https://doi.org/10.7868/S0016675815100124>

Ancient and Modern Hybridization of Siberian Stone Pine and Dwarf Siberian Pine in the South of Yakutia

M. M. Belokon^{a, *}, Yu. S. Belokon^a, E. A. Petrova^b, G. V. Vasileva^b,
A. P. Efimova^c, E. S. Zakharov^{c, d}, S. N. Goroshkevich^b, and D. V. Politov^a

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bInstitute of Monitoring of Climatic and Ecological Systems, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634055 Russia

^cInstitute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Yakutsk, 677007 Russia

^dAmmosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, 677980 Russia

*e-mail: belokon@vigg.ru

The hybridization zone on the northern border of the overlapping ranges at the junction of the Prilensky Plateau with the Stanovoj and Aldan highlands was studied using the analysis of the genotypes of adult plants of dwarf Siberian pine, *Pinus pumila* (Pall.) Regel, and Siberian stone pine, *Pinus sibirica* Du Tour, by allozymes (nuclear codominant markers with biparental inheritance) and mtDNA. Evidence of modern hybridization of these species, as well as past hybridization events, has been obtained. Our study revealed that in the conditions of Southern Yakutia, hybridization takes place mainly unidirectionally with an asymmetric flow of genes between species. In most of the studied samples from the sympatry zone, the replacement of the mitochondrial genomes of *Pinus sibirica* with the genomes of *Pinus pumila* is noted. Probably, this phenomenon can be adaptive and contribute to the expansion of the range of Siberian stone pine.

Keywords: Siberian stone pine, *Pinus sibirica*, dwarf Siberian pine, *Pinus pumila*, hybridization, introgression, allozymes, *nad1* intron2.

УДК 582.734.2:575

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ РОССИЙСКИХ ВИДОВ РОДА *Spiraea* (Rosaceae) ПО ДАННЫМ НУКЛЕОТИДНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РЕГИОНА ITS ЯДЕРНОЙ рДНК

© 2022 г. Т. А. Полякова¹*, А. В. Шатохина¹, Д. В. Политов¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: tat-polyakova@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.05.2022 г.

После доработки 08.06.2022 г.

Принята к публикации 15.06.2022 г.

Приводятся результаты изучения изменчивости последовательностей региона ITS рДНК для 17 видов рода *Spiraea* (Magnoliopsida: Rosaceae), встречающихся в пределах российской части ареалов и на сопредельных территориях. Результаты демонстрируют наличие однонуклеотидных замен (транзиций и трансверсий) и делеций/инсерций, в том числе специфических на уровне подродов, секций, циклов и рядов. Изменчивость в межгенном спейсере ITS1 выше, чем в ITS2. Подчеркивается высокая значимость ITS как молекулярного маркера в разрешении филогенетических взаимоотношений в роде *Spiraea*. Близкородственные виды *Spiraea*, как правило, различаются по последовательностям ITS, однако наибольшие затруднения в идентификации таксонов имеет полиморфная секция *Chamaedryon*. Филогенетический анализ, проведенный разными способами (ML, MP, BI), подтверждает монофилетическое происхождение рода *Spiraea* и древних секций *Spiraea* и *Calospira*. Сформулирована гипотеза о парафилетической природе более эволюционно молодой, разнообразной и самой богатой по числу видов секции *Chamaedryon*. Предполагается, что парафилия секции *Chamaedryon* связана с дивергенцией признаков и последующим обособлением видов наряду с многократными миграциями под влиянием контрастных экологических условий.

Ключевые слова: *Spiraea*, *Calospira*, *Chamaedryon*, триба Spiraeaceae, ITS, рДНК, нуклеотидная изменчивость, транзигция, трансверсия, филогения, монофилия, парафилия.

DOI: 10.31857/S0016675822110091

Современные методы и подходы для решения проблем систематики и эволюции растений напрямую связаны с успешным развитием молекулярно-генетических технологий, таких как ПЦР и секвенирование. С помощью анализа нуклеотидных последовательностей того или иного варибельного информативного участка генома растений стало возможным проверить, подтвердить или опровергнуть филогенетические гипотезы, предложенные ранее на основании сравнительно-морфологических, цитологических и/или биохимических данных.

Анализ данных по изменчивости нуклеотидных последовательностей стал неотъемлемой частью реконструкции эволюционной истории любых организмов. По мере накопления молекулярно-генетических исследований оказалось очевидным, что для решения различных задач требуются разные молекулярные инструменты из-за различающихся скоростей эволюции разных генов и геномов. Поэтому на первом этапе необходимо выбрать такой фрагмент ДНК, чтобы скорость накопления за-

мен в нем соответствовала поставленной проблеме, в частности филогенетической.

Для изучения филогенетических взаимоотношений таксонов на уровне родов и видов таким молекулярным инструментом стал регион ITS, включающий внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 и ген 5.8S цистрона ядерной рибосомной ДНК (рДНК). Медленно эволюционирующие гены рРНК используются на высших таксономических уровнях [1], в то время как на низких таксономических уровнях более эффективен анализ внутренних транскрибируемых межгенных спейсеров [2–4]. Интерес таксономистов к ITS рДНК обусловлен наличием в ее составе как эволюционно консервативных кодирующих участков, позволяющих использовать универсальные праймеры, так и быстро эволюционирующих некодирующих спейсерных последовательностей, обладающих значительной межвидовой изменчивостью. Уровень изменчивости ITS-последовательностей обычно обеспечивает более высокие уровни дивергенции и следовательно более высокое разре-

шение и более сильную поддержку в сравнении с хлоропластными локусами для одних и тех же образцов [5]. Кроме того, рибосомная ДНК дает возможность анализировать ядерный геном, тогда как цитоплазматические (хлоропластные и митохондриальные) фрагменты демонстрируют унисипернтальное наследование.

Гены рРНК и межгенные спейсеры ITS присутствуют в ядерном геноме растений в виде тандемно расположенных и многократно повторенных копий, что увеличивает потенциальную пользу и надежность этих регионов в филогенетических исследованиях [3, 6], а также позволяет успешно амплифицировать их как из свежесобранных, так и из гербарных образцов, в том числе хранящихся десятилетиями. Для ITS-региона характерна быстрая, но в то же время согласованная эволюция, приводящая к гомогенизации всех копий последовательностей ITS в геноме, что позволяет проводить прямое секвенирование продуктов ПЦР с получением единственной доминирующей, а значит репрезентативной, последовательности [7]. Это особенно важно для корректной реконструкции филогении видов и родов растений.

Род *Spiraea* L. принадлежит к обширному и экономически важному семейству Розоцветные (Rosaceae Juss.). Спиреи произрастают в умеренных и субтропических зонах Северного полушария. Южная граница в Азии проходит по восточным и северным Гималаям, в Америке южная граница проходит по центральной части Мексики [8]. Род насчитывает около 20–25 таксонов на территории России и на сопредельных территориях бывших республик [9]. Основное видовое разнообразие *Spiraea* сосредоточено в Восточной Азии (около 70 видов в Китае) [10].

Согласно классификации, принятой во Флоре СССР [9], род *Spiraea* подразделяется на два подрода и три секции. В более древний подрод *Protospiraea* Nakai входят две секции: *Spiraea* Ser. с двумя видами (*S. salicifolia* L., *S. humilis* Pojark.), имеющими метелки розового цвета, и *Calospira* C. Koch, включающая три вида (*S. betulifolia* Pall., *S. beauverdiana* C.K. Schn., *S. baldschuanica* B. Fedtsch.) со сложными белыми щитками. Эволюционно более молодой подрод *Metaspiraea* Nakai включает в себя морфологически разнообразную и самую многочисленную по числу видов секцию *Chamaedryon* Ser., виды которой имеют простые щитки и зонтики белого цвета. Китайские систематики выделяют в этом подроде еще одну секцию *Glomerati* Nakai [11], которая во Флоре СССР имеет ранг ряда *Hypericifoliae* Pojark. [9] или является синонимом секции *Sciadantha* K. Koch. [12]. А. Пояркова дает более подробную классификацию секций, разделив их на циклы и ряды, опираясь при этом на такие видовые признаки, как форма и край ли-

стовой пластинки, форма и опушение годичных побегов, число наружных чешуй пазушных почек.

Существующие классификации рода *Spiraea*, предложенные разными авторами [9–13], в целом не противоречат общей идее системы рода, основанной на изменчивости морфологических признаков соцветий, и дополняют друг друга, однако не все российские виды “вписываются” в существующую систему рода, принятую китайскими систематиками [11], а также таксономические проблемы некоторых сложных видовых комплексов остаются открытыми. До сих пор общепризнанная мировая сводка по внутривидовой и внутривидовой таксономии отсутствует.

Филогения видов рода непосредственно связана с их таксономией. Ведутся работы по систематике отдельных таксонов *Spiraea* [14, 15], в том числе по хемотаксономии [16–18], по определению числа хромосом [19, 20] и установлению размера ядерного генома [21] как одних из важных маркеров для изучения полиплоидных растений. Таксономическая путаница возникает чаще всего вследствие слабых морфологических различий близкородственных видов *Spiraea*, а также способности особой образовывать спонтанные гибриды в местах симпатрии из-за отсутствия барьеров для скрещивания. Факты интрогрессивной гибридизации близких видов *Spiraea* описываются по морфологическим признакам [9, 15], переходные формы зарегистрированы в отечественных и зарубежных Гербариях, однако ни один из гибридов достоверно не подтвержден. Способность близкородственных таксонов к образованию гибридов, выявленная внутривидовая изменчивость морфологических признаков в роде *Spiraea* [14, 15], наличие полиплоидных рас, а также возможная нестабильность цитотипов за счет наличия миксоплоидии и/или анеуплоидии обуславливают возникающие неоднозначности при определении и частые ошибки в идентификации таксонов *Spiraea* [15].

Изучение рода *Spiraea* с привлечением молекулярно-генетических маркеров началось в начале 2000-х гг. с целью разрешения проблем филогении, таксономии и филогеографии [22–25]. Преимущественно используемые для идентификации видов рода *Spiraea* молекулярные маркеры – регион ITS рДНК и хлоропластный межгенный спейсер *trnL-trnF*.

На филогенетическом дереве, построенном на основе анализа фрагментов хлоропластного генома *trnL-trnF*, отсутствие согласованности корейских видов спиреи с морфологией и с географическим распространением объясняется наличием как частых ошибок в идентификации видов спиреи, так и встречающихся в естественных популяциях гибридных особей [23].

Данные по филогении рода *Spiraea*, полученные китайскими исследователями на основе анализа региона ITS и шести фрагментов хлоропластной ДНК [25], противоречат существующей системе рода *Spiraea* [9], не соответствуя делению на три группы, характеризующие секции, а также не согласуются с ранними молекулярно-генетическими исследованиями [22]. Однако в ранних работах исследовалось небольшое число видов *Spiraea* китайского, корейского и североамериканского происхождения. Филогенетические исследования российских видов *Spiraea* на основе молекулярных маркеров начаты недавно [22]. Взаимоотношения внутри рода *Spiraea*, выявленные по молекулярным маркерам позднее, также противоречивы [26] и, таким образом, полностью не разрешены.

Цель данного исследования — оценка значимости ITS-региона рДНК в филогении российских видов рода *Spiraea* и установление филогенетических взаимоотношений изученных видов *Spiraea*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) выявить изменчивость нуклеотидных последовательностей ITS-региона рДНК у наибольшего числа доступных видов рода *Spiraea*, данные по которым отсутствуют; 2) проанализировать информативность ITS-региона для выявления взаимоотношений видов *Spiraea* внутри рода; 3) провести сравнительный анализ филогенетических деревьев, построенных различными способами, и дать оценку полученным филогенетическим реконструкциям рода *Spiraea*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения ДНК использованы образцы растений, собранные лично во время полевых сборов с 2001 по 2021 гг., а также из коллекций отечественных гербариев (LE, SASY, ALTB, SVR). Всего изучено 17 видов: *S. salicifolia* L., *S. humilis* Pojark., *S. betulifolia* Pall., *S. beauverdiana* C.K. Schn., *S. chamaedryfolia* L., *S. flexuosa* Fisch. ex Cambess., *S. elegans* A. Pojark., *S. media* Schmidt, *S. sericea* Turcz., *S. dahurica* Maxim., *S. alpina* Pall., *S. trilobata* L., *S. pilosa* Franch., *S. pubescens* Turch., *S. crenata* L., *S. hypericifolia* L., *S. aquilegifolia* Pall., собранных в российской части ареалов (рис. 1).

ДНК выделяли из высушенных в силикагеле листьев, а также из гербарных образцов как по стандартным методикам для растительных тканей с применением цетилтриметиламмонийбромидом (СТАВ) [27], так и коммерческим набором для выделения геномной ДНК из растений — Mag-MAX DNA Multi-Sample Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию и количество ДНК определяли на спектрофотометре Implen Nano-Photometer P-Class (P-360) (IMPLEN, Германия). Для амплификации фрагментов ДНК использовали набор реагентов GenePak® PCR Core (ООО “Лабо-

ратория Изоген”, Россия). Для амплификации фрагмента ITS оперона использовали праймеры ITS6 и ITS9, разработанные для восточноазиатских видов трибы Spiraeae [22]. Цикл амплификации включал: денатурацию при 94°C в течение 1 мин, отжиг праймеров при 58°C в течение 50 с и элонгацию при 72°C в течение 1 мин с числом циклов 30. Все полученные ПЦП-фрагменты проверяли с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле и очищали набором реагентов для быстрой элюции ДНК из агарозных гелей Diatom DNA Elution (ООО “Лаборатория Изоген”). Секвенирование фрагментов ITS проводили в ЗАО “Евроген”, а также самостоятельно на автоматическом анализаторе модели ABI PRISM 3500. Секвенирующая реакция проводилась с BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit. Очистка продуктов после секвенирующей реакции проводилась набором BigDye XTerminator Purification Kit. Сиквенсы просматривались в Data Collection v3.1 и считывались с помощью программного обеспечения Sequence Analysis Software v6. Сиквенсы попарно выравнены в программе BioEdit v7.0.5.3 [28], множественное выравнивание выполнено в программе ClustalW2 с последующей визуальной проверкой спорных позиций на хроматограммах.

Эволюционные построения выполнены в программе MEGA 11 [29]. Эволюционные дистанции получены методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с использованием модели Тамуры—Нея [30], методом парсимонии (Maximum Parsimony, MP) с использованием алгоритма SPR (Subtree-Pruning-Regrafting) [31]. Консенсусные деревья построены с бутстреп-поддержкой в 1000 реплик [32]. Филогенетическая реконструкция выполнена также в программе MrBayes (BI) [33] с использованием параметров эволюционной модели GTR (General Time Reversible Model) с гамма-распределением, с 1000000 поколений с частотой сэмпирования каждое тысячное поколение. Визуализация филогенетического дерева выполнена в программе FigTree v1.4.4 [34].

Всего в предварительном анализе изменчивости ITS было охвачено около 230 нуклеотидных последовательностей, из них 200 получены нами (прямых и обратных), часть последовательностей близкородственных североамериканских и азиатских видов привлечены из EMBL/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). В филогенетическом анализе использовали 60 последовательностей ITS, которые характеризовались отсутствием полиморфных позиций. В качестве внешней группы взяты образцы *Physocarpus opulifolia* (L.) Maxim. и *Sorbaria sorbifolia* (L.) A. Braun. Полученные нами последовательности ITS депонированы в GenBank (KU321584—KU321585, KU321587—KU321589, KU321591).

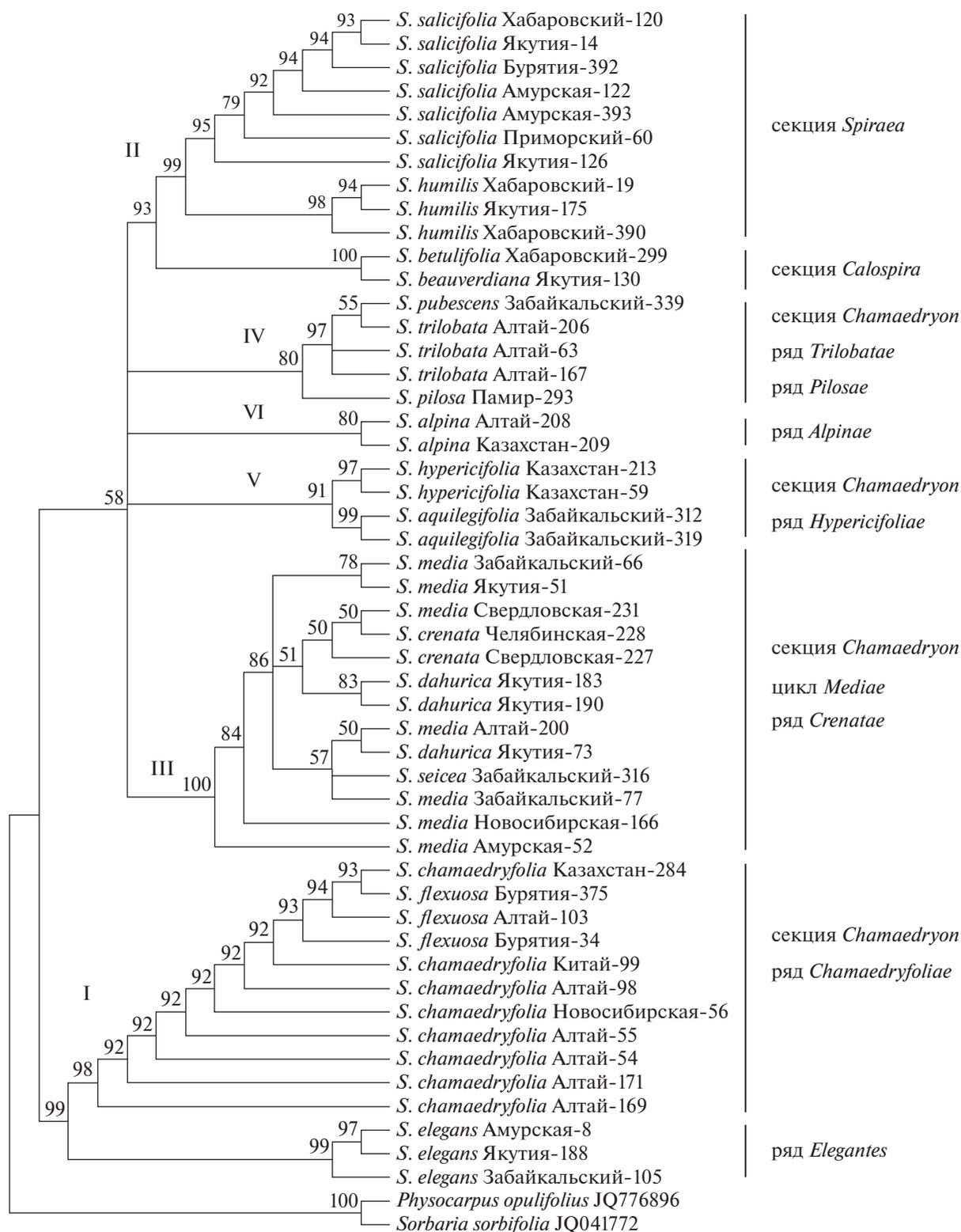


Рис. 1. Консенсусное филогенетическое дерево, построенное на основе метода максимальной парсимонии МР с использованием алгоритма Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) с 1000 реплик. В узлах ветвления указана поддержка бутстрепа (%). Узлы с поддержкой менее 50% не представлены. I–VI — номера клад.

Таблица 1. Характеристики ITS1–5.8S–ITS2 – региона рДНК у изученных видов рода *Spiraea*

Показатель	ITS1	5.8S	ITS2
Выровненная длина, пн	249–254	167	218–227
GC-состав, %	64.7	56.6	70.3
Число константных сайтов	214	164	194
Число вариабельных сайтов	45	3	37
Число филогенетически информативных сайтов	39	2	33

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменчивость региона ITS ядерной рДНК у Spiraea

Для 12 таксонов *Spiraea* последовательности ITS-региона получены нами ранее, для многих из них впервые [35]. В данном исследовании последовательности ITS получены впервые для трех видов (*S. humilis*, *S. beauverdiana*, *S. pilosa*).

В результате амплификации с праймерами ITS6 и ITS9 для 200 образцов 17 видов *Spiraea* получены фрагменты длиной около 750 пн, включающие полноразмерный регион ITS1–5.8S–ITS2 и частично гены 18S и 26S рРНК.

Длина ITS-региона видов *Spiraea* разного происхождения, принадлежащих ко всем известным секциям, составляет от 634 до 648 пн, из них 572 позиции являются консервативными и 74 позиции – филогенетически информативные (табл. 1). Как общая длина ITS-фрагмента, так и длины спейсеров ITS1 и ITS2 являются таксоноспецифичными [35].

Сравнительное изучение ITS-фрагментов у изученных видов *Spiraea* показало наличие как инделей, так и генных точечных мутаций – трансверсий и транзиций.

По протяженности, а также по числу константных, вариабельных и филогенетически информативных сайтов спейсеры ITS1 (6 инсерций, 36 точечных замен) и ITS2 (2 инсерции, 32 точечные замены) различаются незначительно, но спейсер ITS1 более изменчивый, что отмечалось нами ранее для сибирских видов секции *Chamaedryon* [35]. Для области гена 5.8S характерна ожидаемая консервативность, его длина составила 167 пн у всех исследуемых образцов. Уровень GC-состава высокий, более 60% (табл. 1).

Сходные данные указываются для *S. japonica* L. и ее разновидностей, для которых впервые приводится характеристика последовательностей ITS. Длина региона ITS варьирует от 632 до 639 пн, содержание GC составляет 64% [36].

Анализ нуклеотидного полиморфизма ITS-региона позволил выявить видоспецифические (аутопоморфные) нуклеотидные замены. В некоторых случаях сложно определяемый вид *S. flexuosa* отличается от родственных ему видов *S. chamaedryfolia* и *S. elegans* по пяти мутациям (транзи-

циям и трансверсиям), расположенным как в ITS1, так и ITS2. Близкие виды *S. chamaedryfolia* и *S. elegans* различаются по трем мутациям.

Инсерции/делеции наблюдались как в области ITS1, так и ITS2. Вставка в три нуклеотида -GCT- в ITS1 обнаружена у видов секции *Spiraea* и полностью отсутствует в секции *Chamaedryon*. Инсерция -TT- в спейсере ITS1 наблюдается только у близких видов родства *S. chamaedryfolia* s.l., относящихся к секции *Chamaedryon* (ряд 1 – *Chamaedryfoliae* и ряд 2 – *Elegantes*).

Для спейсера ITS2 характерны две инсерции/делеции. В позиции 435–442 обнаружены две видоспецифические инсерции: для всех образцов *S. trilobata* – -CCCCGCG- и для *S. hypericifolia* – -ACCCCGCG-. В позиции 638–642 вставка -TTATG- наблюдается только у видов *S. salicifolia* и *S. humilis*, принадлежащих к общей секции *Spiraea*.

Филогенетический анализ видов рода Spiraea на основе последовательностей ITS-региона

Для познания эволюционной динамики рДНК и ее природы, а также распознавания паралога и псевдогена было изучено большое число последовательностей ITS особей одного таксона и близких таксонов. Как правило, среди особей таких видов *Spiraea*, как *S. flexuosa*, *S. media*, *S. salicifolia*, часто встречаются последовательности с несколькими полиморфными позициями, подтверждающимися и при секвенировании с обратным праймером. Такие последовательности с полиморфными позициями чаще всего являются свидетельством наличия вариантов, не прошедших окончательную гомогенизацию, а следовательно они могут являться в том числе и филогенетически отдаленными последовательностями [7]. Такие особи с полиморфными позициями в филогенетический анализ не были включены. Из филогенетического анализа также были исключены последовательности морфологически очевидных предполагаемых гибридных образцов, хотя наличия гибридов на филогенетическом дереве мы не исключаем.

На основе массива данных последовательностей ITS различных видов *Spiraea* построены фи-

Таблица 2. Сравнение значений индексов бутстреп-поддержки (%) для групп, объединяющих секции и/или ряды, по результатам филогенетического анализа с использованием различных методов

Клада	ML	MP	BI
I. Секция <i>Chamaedryon</i> , ряд <i>Chamaedryfoliae</i> , ряд <i>Elegantes</i>	98	99	100
II. Секция <i>Spiraea</i> , секция <i>Calospira</i>	83	93	94
III. Секция <i>Chamaedryon</i> , цикл <i>Mediae</i> , ряд <i>Crenatae</i>	97	100	100
IV. Секция <i>Chamaedryon</i> , ряд <i>Pilosae</i> , ряд <i>Trilobatae</i>	76	80	99
V. Секция <i>Chamaedryon</i> , ряд <i>Hypericifoliae</i>	80	91	63
VI. Секция <i>Chamaedryon</i> , ряд <i>Alpinae</i>	86	80	53

логенетические деревья с применением различных методов и моделей. Все деревья (MP, ML, BI) оказались топологически схожи. Сравнение поддержки узлов для таких группировок как секции и ряды на деревьях, построенных разными методами (табл. 2), показывает более низкие значения поддержки при использовании метода максимального правдоподобия (ML) и более высокие — при использовании байесовского метода (BI).

Топология филогенетических деревьев (MP, BI) демонстрирует монофилетическое происхождение рода *Spiraea* и образование шести клад с высокими и средними бутстреп-поддержками (рис. 1, 2). Клада I объединяет близкородственные виды секции *Chamaedryon* — *S. chamaedryfolia*, *S. flexuosa*, принадлежащие к ряду *Chamaedryfoliae*, и *S. elegans* из ряда *Elegantes* [9]. Клада подразделена на две субклады — одна образована образцами *S. elegans* из различных мест произрастания, а вторая объединяет виды ряда *Chamaedryfoliae*, однако образцы *S. flexuosa* попадают между образцами *S. chamaedryfolia* различного происхождения (рис. 1), что указывает либо на подвидовой ранг *S. flexuosa*, либо на принадлежность особей к гибридным.

В кладу II вошли две древние секции: *Spiraea* (с близкими видами *S. salicifolia*, *S. humilis*) и *Calospira* (с близкими видами *S. betulifolia*, *S. beauverdiana* цикла *Betulifoliae* по Поярковой [9]). На дереве близкие виды *S. salicifolia* и *S. humilis* хорошо дифференцированы, так же как и *S. betulifolia* и *S. beauverdiana* образующие отдельную субкладу.

Клада III включает близкие виды секции *Chamaedryon* цикла *Mediae* (*S. media*, *S. sericea*, *S. dahurica*) и ряда *Crenatae* (*S. crenata*). Эти виды слабо дифференцированы на филогенетических деревьях (рис. 1, 2), возможны особи гибридного происхождения.

Клады IV, V и VI демонстрируют более низкие поддержки (63–99%) в сравнении с кладами I, II и III, имеющими более высокие бутстреп-поддержки, 83–100% (табл. 2). Все три клады (IV, V и VI) включают остальные виды секции *Chamaedryon*: IV — близкородственные виды ряда *Hypericifoliae* (*S. hypericifolia*, *S. aquilegifolia*), образующие отдельные кластеры; V — виды ряда *Pilosae* (*S. pilosa*,

S. pubescens) и ряда *Trilobatae* (*S. trilobata*); VI — виды ряда *Alpinae* (*S. alpina*). Все близкородственные таксоны ожидаемо оказались в сестринских субкладах, но не все хорошо дифференцируются (рис. 1, 2).

Конфликта таксономических данных на филогенетических деревьях не наблюдается, однако виды секции *Chamaedryon* не образуют хорошо поддерживаемых субклад, за исключением видов родства *S. media* s.l. (100% BI). На BI-дереве клады формируются в несколько ином порядке, однако состав видов в кладах совпадает полностью, клады V и VI, распознаваемые на MP-дереве, объединяются в одну на BI-дереве (рис. 2).

Филогенетические исследования рода *Spiraea* предпринимались неоднократно и показывали противоречивые результаты. Первое наиболее полное филогенетическое исследование рода *Spiraea*, включающее 24 вида, было основано на объединенных данных хлоропластных (*trnL-trnF*) и ядерных (ITS1, 5.8S, ITS2) локусов [22]. Монофилетическая природа рода подтверждается с 95%-ной байесовской постериорной вероятностью, однако монофилия ни одной из секций не поддерживается в данном исследовании. Филогенетический анализ позволил предположить, что виды рода *Spiraea* со сложными щитками (секция *Calospira*) являются предковыми. Кроме того, возможно, что все три типа соцветий, наблюдаемых в роде *Spiraea* (сложный щиток, метелка, простой зонтик), могли быть утеряны в ходе эволюции и вновь образованы по крайней мере дважды [22].

Парафилетическое происхождение рода *Spiraea* было показано на проведенном кладистическом анализе морфологических признаков [37]. Одна группа включала секции *Spiraea* и *Calospira* подрода *Protospiraea*, близкие к роду *Sibiraea*; другая — виды подрода *Metaspiraea*, сестринские к родам трибы *Spiraeae* (*Kelseya*, *Luetkea*, *Petrophyton* и *Xerospiraea*). В работе Potter, Still [23] род *Spiraea* попадает в одну группу с *Sibiraea*, *Petrophyton* и *Kelseya*. Расхождение с результатами Henrickson [37] Potter и Still связывают с ограниченным числом взятых для анализа морфологических признаков, демонстрирующих потенциально инфор-

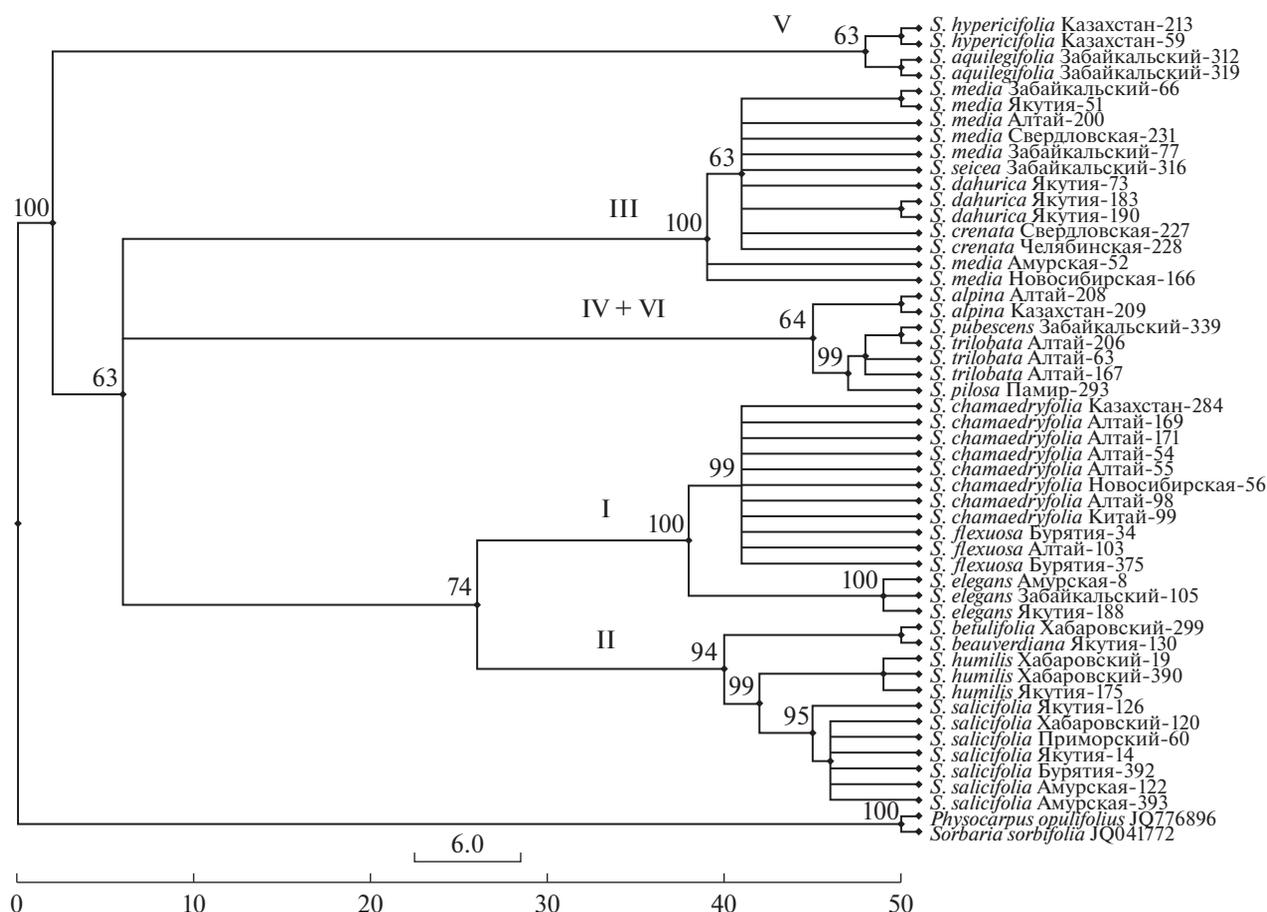


Рис. 2. Консенсусное филогенетическое дерево, построенное на основе байесовского метода BI с использованием модели GTR с гамма-распределением, с 10000000 поколений с частотой сэмплинга каждое тысячное поколение. В узлах ветвления указана поддержка бутстреп (%). Узлы с поддержкой менее 50% не представлены. I–VI – номера клад.

мативные паттерны изменчивости, характерные не только для рода *Spiraea*, но и для других родов трибы Spiraeae, а также с гомоплазией по меньшей мере некоторых из признаков, таких как тип соцветия, габитус и другие, наиболее важные для реконструкции классификации рода *Spiraea*.

Несмотря на широкую видовую представленность (24 вида) в другом филогенетическом анализе, проведенном на основе ITS и *trnL-trnF*, и кажущуюся очевидность дивергенции рода, возникают неопределенности, которые сложно объяснить. Так, тип соцветий, по мнению Potter и Still [23], лежащий в основе распознавания секций, не подтверждается в качестве надежного индикатора взаимоотношений внутри рода *Spiraea*, как было показано ранее, хотя некоторые корреляции этого прослеживаются. Вид *S. decumbens* Koch. со сложными щитками, характерными для секции *Calospira*, на дереве оказался в кладе, сестринской по отношению ко всему роду. Виды с простыми зонтиками из секции *Chamaedryon* находились в одной высоко поддерживаемой кладе

(96% MP, 100% BI) с видами из неродственной секции *Spiraea*. Также результаты филогенетических взаимоотношений *Spiraea*, выявленных методом AFLP, оказались несовместимы с принципами переходной изменчивости морфологических признаков соцветий и побегов [26], высказанными ранее.

Наиболее полный филогенетический анализ рода *Spiraea* был выполнен сравнительно недавно на основе изменчивости молекулярных (*trnL-trnF*, ITS) и морфологических маркеров для 55 видов [38]. Анализ данных также подтверждает монофилию рода *Spiraea*, однако остальные выдвигаемые гипотезы не только не соответствуют обсуждаемым ранее, но и демонстрируют новые результаты, такие как полифилия обоих подродов, полифилия двух неродственных секций – *Calospira* и *Chamaedryon*, парафилия секции *Glomerati*. Сформированные клады (5) включают виды из разных секций; есть и неточности: вид *S. elegans* из секции *Chamaedryon* ошибочно отнесен (или попал в результате анализа) в секцию *Calospira*. Секция *Spiraea* попала внутрь секции *Calospira* [38]. Попа-

дание различных видов из разных секций в одну кладу авторы объясняют отражением интенсивных изменений морфологических признаков между секциями, вызываемых динамичными, постоянно изменяющимися условиями среды обитания и орोगрафическими факторами Гималаев [25, 38].

Наши данные показывают, что более древний подрод *Protospiraea* и две его секции — *Spiraea* и *Calospira* — имеют монофилетическое происхождение (рис. 1). Тогда как для второго подрода *Metaspiraea* и более молодой и богатой на виды секции *Chamaedryon*, включаемой в этот подрод, характерна парафилия. Одна высоко поддерживаемая клад (II) включает в себя комплекс близкородственных лесных видов-мезофитов, встречающихся под пологом леса. Другая группа объединяет несколько клад (III–VI) с видами, предпочитающими более ксерофитные условия — остепненные ценозы, скалистые обнажения, солнечные опушки лесов, т.е. это кустарники с ксероморфными признаками (более узкие листья, более опушенные листья и годичные побеги и т.д.). Вероятно, в ходе эволюции происходили дивергенция признаков и последующее обособление видов наряду с многократными миграциями под влиянием экологических условий.

Таким образом, выявленная степень генетических различий ITS-региона у видов *Spiraea* является высокоинформативной для изучения родственных связей таксонов в роде; обнаружены видоспецифические однонуклеотидные замены, inserции/делеции длиной в несколько нуклеотидов, имеющие таксономическое значение на уровне подродов, секций, циклов и рядов.

Наши данные подтверждают монофилетическое происхождение рода *Spiraea*, а также более древнего подрода *Protospiraea* и его секций — *Spiraea* и *Calospira*. Выдвинута гипотеза о парафилетическом происхождении эволюционно молодого подрода *Metaspiraea* и его секции *Chamaedryon*. Расхождение видов в этой секции, вероятнее всего, связано с их приспособлением к контрастным экологическим условиям наряду с многократными миграциями.

Согласно правдоподобию филогенетических гипотез, подтверждающихся на основании сравнения последовательностей ITS1 и ITS2 [39], наши предположения о филогенетических связях видов *Spiraea* могут служить основой для ревизии рода, однако не все взаимоотношения между видами *Spiraea* остаются полностью разрешенными. Для выдвижения более взвешенных филогенетических выводов предложенная на основе изменчивости ITS гипотеза о парафилии секции *Chamaedryon* будет проверена на большем числе видов, с привлечением последовательностей низкокопийных генов ядерного генома в силу их очевидных преимуществ, в частности перед хлоропластными

маркерами. На основе таких данных в конечном итоге может быть предложена новая классификация рода *Spiraea*.

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе образцов *Spiraea* в Забайкальском крае Е.А. Бондаревичу (ЧГМА, Чита) и предоставленные гербарных образцов из Свердловской и Челябинской областей М.А. Полежаевой (ИЭРиЖ УрО РАН, Екатеринбург).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-03093, а также в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН № 0112-2019-0001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Soltis D.E., Soltis P.S. Choosing an approach and appropriate gene for phylogenetic analysis // Molecular Systematics of Plant II: DNA Sequencing. Norwell, MA: Kluwer Academic, 1998. P. 1–42.
2. Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M. et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // Ann. Missouri Bot. Garden. 1995. V. 82. P. 247–277.
3. Alvarez I.A., Wendel J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Mol. Phylogenet. Evol. 2003. V. 29. № 3. P. 417–434.
4. Bailey C.D., Carr T.G., Harris S.A., Hughes C.E. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes // Mol. Phylogenet. Evol. 2003. V. 29. P. 435–455. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2003.08.21>
5. Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F. Chloroplast phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) // Am. J. Botany. 1997. V. 84. P. 1120–1136.
6. Hershkovitz M.A., Zimmer E.A., Hann W.J. Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematics // Molecular Systematics and Plant Evolution / Eds Hollingsworth P.M., Bateman P.M., Gornall R.J. London: Taylor & Francis, 1999. P. 268–326.
7. Small R.L., Cronn R.C., Wendel J.F. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants // Australian Syst. Bot. 2004. V. 17. P. 145–170. <https://doi.org/10.1071/SB03015>
8. Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. Т. III. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. С. 267–327.
9. Полякова А.И. Подсемейство *Spiraeoideae* Agardh // Флора СССР. Т. 9 / Под. ред. Комарова В.Л. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1939. С. 279–318.
10. Lingdi L., Alexander C. *Spiraea* // Flora of China. V. 9. St. Louis: Missouri Bot. Garden Press, 2003. P. 47–73.
11. Yü T.T., Kuan K.C. Taxa nova *Rosacearum sinicarum* // Acta Phytotaxa. 1963. Sin. 8. P. 202–234.
12. Businský R. Transitive inflorescence types in *Spiraea* (Rosaceae–Spiraeoideae) undermine the fundamental

- classification concept of the genus // *Phyton*. 2015. № 55. P. 69–120.
13. *Rehder A.* Manual of Cultivated Trees and Shrubs. Portland: Dioscorides Press, 1940. P. 322–342.
 14. *Полякова Т.А.* Внутривидовая изменчивость видов рода *Spiraea* L. (Rosaceae) секции *Chamaedryon* Ser. в Сибири и на Дальнем Востоке России // Растения в муссонном климате. IV: Материалы четвертой науч. конф. “Растения в муссонном климате” (Владивосток, 10–13 октября 2006 г.) / Под ред. Гончаровой С.Б. Владивосток: БСИ ДВО РАН, 2007. С. 234–238.
 15. *Полякова Т.А.* Изменчивость морфологических признаков и популяционная структура *Spiraea ussuriensis* s.l. (Rosaceae) // Эволюционная и популяционная экология (назад в будущее): Материалы конф. молодых ученых (30 марта–3 апреля 2009 г.). Екатеринбург: Гошицкий, 2009. С. 167–173.
 16. *Карпова Е.А., Полякова Т.А.* Сезонная динамика состава фенольных соединений листьев *Spiraea media* var. *sericea* (Turch) Regel // Химия растительного сырья. 2014. № 3. С. 145–149.
 17. *Костикова В.А., Полякова Т.А.* Эколого-географическая изменчивость *Spiraea betulifolia* Pall. и *S. beauverdiana* Schneid. по морфологическим и биохимическим маркерам // Сиб. экол. журн. 2014. № 3. С. 413–421.
 18. *Kostikova V.A., Troshkina V.* Notes on the taxonomy of *Spiraea aemiliana* and related species (Rosaceae) in Russia // BIO Web of Conferences 16, 00014 (2019); Intern. conf. “Results and Prospects of Geobotanical Research in Siberia”, 2019. 4 p. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191600014>
 19. *Полякова Т.А., Муратова Е.Н.* Кариологическое исследование некоторых видов рода *Spiraea* (Rosaceae) флоры Дальнего Востока и Восточной Сибири // Растительный мир Азиатской России. 2015. № 2(18). С. 23–26. <http://izdatgeo.ru/pdf/rast/2015-2/23.pdf>
 20. *Poliakova T.A., Shatokhina A.V.* IAPT chromosome data 35/12 // *Taxon* / Eds Marhold K. et al. 2021. V. 70(6). P. 1402–1411. E35–E36. <https://doi.org/10.1002/tax.12638>
 21. *Kostikova V.A., Voronkova M.S., Banaev E.V., Poliakova T.A.* The estimation of relative DNA content of the genus *Spiraea* L., section *Calospira* C. Koch. // *Bot. Pac.* 2018. № 7(1). P. 93–96. <https://doi.org/10.17581/bp.2018.07114>
 22. *Полякова Т.А., Шатохина А.В.* Филогенетические взаимоотношения российских видов рода *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.) по морфологическим и молекулярным данным // 50 лет без К.И. Мейера: XIII Московское совещание по филогении растений: Материалы междунар. конф. (2–6 февраля 2015 г., Москва) / Под ред. Тимонина А.К. М.: МАКС Пресс, 2015. С. 263–265.
 23. *Potter D., Still S.M.* Phylogenetic relationships in tribe Spiraeae (Rosaceae) inferred from nucleotide sequence data // *Pl. Syst. Evol.* 2007. № 266. P. 105–118.
 24. *Huh M.K.* Analysis of the phylogenetic relationships in the genus *Spiraea* based on the nuclear ribosomal DNA ITS region // *J. Life Science.* 2012. V. 22. № 3. P. 285–292.
 25. *Khan G., Zhang F.Q., Gao Q.-B. et al.* Phylogenetic analyses of *Spiraea* (Rosaceae) distributed in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent regions: insights from molecular data // *Plant Syst. Evol.* 2015. <https://doi.org/10.1007/s00606-015-1238-6>
 26. *Drábková L.Z., Pospíšková M., Businský R.* Phylogeny and infrageneric delimitation in *Spiraea* (Rosaceae) inferred from AFLP markers and a comparison with morphology // *Bot. J. Linnean Society.* 2017. V. 185. P. 525–541. <https://orcid.org/0000-0003-1140-6607>
 27. *Doyle J.J., Doyle J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus.* 1990. V. 12. P. 12–15.
 28. *Hall T.A.* BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Ac. Symposium.* 1999. Ser. 41. P. 95–98.
 29. *Tamura K., Stecher G., Kumar S.* MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // *Mol. Biol. Evol.* 2021. № 38. P. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
 30. *Tamura K., Nei M.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Mol. Biol. Evol.* 1993. № 10. P. 512–526.
 31. *Nei M., Kumar S.* *Molecular Evolution and Phylogenetics.* N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000.
 32. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. № 39. P. 783–791.
 33. *Ronquist F., Huelsenbeck J.P.* MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics.* 2003. V. 19. P. 1572–1574.
 34. *Rambaut A.* FigTree, version 1.4.4. 2014. <https://www.softpedia.com/get/Science-CAD/FigTree-AR.shtml>
 35. *Полякова Т.А., Шатохина А.В., Ширманов М.В., Бондаренко Г.Н.* Оценка таксономических отношений у сибирских представителей секции *Chamaedryon* Ser. рода *Spiraea* L. (Rosaceae Juss.) на основе анализа нуклеотидного полиморфизма ITS-региона // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. Сб. науч. статей по материалам XIV междунар. науч.-практ. конф. (25–29 мая 2015 г., Барнаул). Барнаул, 2015. С. 353–358.
 36. *Zhang Z., Fan L., Yang J. et al.* Alkaloid polymorphism and ITS sequence variation in the *Spiraea japonica* complex (Rosaceae) in China: Traces of the biological effects of the Himalaya-Tibet Plateau uplift // *Am. J. Bot.* 2006. V. 93. № 5. P. 762–769.
 37. *Henrickson J.* *Xerospiraea*, a generic segregate of *Spiraea* (Rosaceae) from Mexico // *Aliso.* 1985. № 11. P. 199–211.
 38. *Yu S.X., Gadagkar S.R., Potter D. et al.* Phylogeny of *Spiraea* (Rosaceae) based on plastid and nuclear molecular data: Implications for morphological character evolution and systematics // *Perspectives in Plant Ecol., Evol. and Syst.* 2018. V. 34. P. 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2018.08.003>
 39. *Родионов А.В., Коцинян А.Р., Гнутиков А.А. и др.* Изменчивость последовательности ITS1-ген 5.8S рРНК-ITS2 в ходе дивергенции видов рода Манник (*Glyceria* R. Br.) // Экол. генетика. 2011. Т. IX. № 4. С. 63–69.

Molecular Phylogeny of Russian Species of the Genus *Spiraea* (Rosaceae) according to the Nucleotide Variability of Its Nuclear rDNA Region

T. A. Poliakova^{a, *}, A. V. Shatokhina^a, and D. V. Politov^a

^aVavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: tat-polyakova@yandex.ru

The results of studying the variability of sequences of the ITS rDNA region for 17 species of the genus *Spiraea* (Magnoliopsida: Rosaceae) occurring within the Russian part of the ranges and in adjacent territories are presented. The results demonstrate the presence of single-nucleotide substitutions (transitions and transversions) and deletions/insertions, including those specific at the level of subgenera, sections, cycles and series. The variability in the intergenic spacer ITS1 is higher than in ITS2. The high importance of ITS as a molecular marker in the resolution of phylogenetic relationships in the genus *Spiraea* is emphasized. Closely related *Spiraea* species usually differ in ITS sequences, but the polymorphic *Chamaedryon* section has the greatest difficulties in identifying taxa. Phylogenetic analysis carried out in various ways (ML, MP, BI) confirms the monophyletic origin of the genus *Spiraea* and the ancient sections *Spiraea* and *Calospira*. A hypothesis is formulated about the paraphyletic nature of the more evolutionarily young, diverse and richest in the number of species section *Chamaedryon*. It is assumed that the paraphilia of the *Chamaedryon* section is associated with divergence of traits and subsequent isolation of species along with multiple migrations under the influence of contrasting environmental conditions.

Keywords: *Spiraea*, *Calospira*, *Chamaedryon*, tribe Spiraeaceae, ITS, rDNA, nucleotide variability, transition, transversion, phylogeny, monophilia, paraphilia.

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА СТЕПНОГО ВОЛКА
РОССИИ И КАЗАХСТАНА ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ© 2022 г. П. А. Казимиров¹ *, С. В. Леонтьев^{2, 3}, А. В. Нечаева¹, М. М. Белоконов¹,
Ю. С. Белоконов¹, А. Я. Бондарев⁴, А. В. Давыдов⁴, Д. В. Политов¹. **¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия²Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Нур-Султан, 010011 Республика Казахстан³Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, 630039 Россия⁴Федеральный центр развития охотничьего хозяйства, Москва, 105118 Россия

*e-mail: farenklaw@gmail.com

**e-mail: dmitri_p@inbox.ru

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

После доработки 30.06.2022 г.

Принята к публикации 01.07.2022 г.

Проведено популяционно-генетическое изучение волка, *Canis lupus* Linnaeus, 1758, на части ареала в России и Казахстане с фокусом на происхождение, состояние генофонда и статус степного волка (номинативный подвид *C. l. campestris*). С помощью анализа 18 ядерных микросателлитных локусов показано, что уровень внутривидового генетического разнообразия степного волка Казахстана достаточно высок, аллельное и генное разнообразие сравнимо с популяциями степного волка других регионов (степи европейского юга России) и лесного и горно-лесного экотипов, населяющих Кавказ, Приуралье и Западную Сибирь. Анализ дифференциации изученных выборок в программе STRUCTURE позволяет сделать заключение о наличии в генофонде степного волка как местного кластера генотипов, так и иммигрантов из соседних, прилегающих к степи с севера, территорий. Обсуждается возможное влияние антропогенного пресса в виде регулирования популяций в советское и постсоветское время и последующая реколонизация из окружающих донорских популяций.

Ключевые слова: волк, *Canis lupus*, степь, генетическое разнообразие, генетическая структура, ДНК, микросателлиты.

DOI: 10.31857/S0016675822110042

Вопрос о подвидах волка *Canis lupus* Linnaeus, 1758 (Mammalia: Carnivora: Canidae), обоснованности их выделения, статусе и генетической основе наблюдаемых морфоэкологических различий широко дискутировался в течение всей истории изучения этого несомненно самого важного для человека крупного хищника [1–3]. Несмотря на способность к распространению на большие расстояния, основную роль в которых играет нательная миграция [4], что должно вести к перемешиванию генетического материала, волк отдельных регионов и природных зон имеет своеобразие морфологических признаков, экологии и поведения, что явилось основанием для выделения многочисленных подвидов. Однако, поскольку подвиды волка обычно связаны не с выраженной дифференциацией формы тела, черепа или иных структур, а в основном с размерами тела и особенностями мехового покрова и его окраски, часто, особенно в англоязычной литературе, они называются эко-

типами, что подчеркивает слабую степень изоляции между ними и неопределенность генетической основы, лежащей за видимыми внешними различиями. Наиболее принятая в России и странах бывшего СССР система подвидов [2, 3, 5] для части ареала волка, охватывающего Россию, Казахстан и государства Средней Азии, включает тундрного волка *C. l. albus* Kerr, 1792, лесного *C. l. lupus* (Linnaeus, 1758), кавказского *C. l. cubanensis* Ognev, 1923, степного *C. l. campestris* Dwigubski, 1804, монгольского/тибетского *C. l. chanco* Gray, 1863 и пустынного *C. l. desertorum* Bogdanov, 1882. Иногда выделяется также сибирский лесной подвид *C. l. altaicus* [1, 5, 6] и некоторые другие [7]. В то же время при тщательном анализе серьезных оснований для подтверждения подвидового статуса, например алтайского волка, выявлено не было [8].

Степной волк не был исключением в ряду дискуссий о правомерности выделения подвидов на основании достаточно слабо выраженных мор-

фологических различий у волков бореальной и умеренной зон Северной Евразии, касающихся главным образом размеров и окраски, т.е. признаков, подверженных отбору в конкретных условиях среды на фоне потенциально интенсивного обмена генами между локальными популяциями. Волк, населяющий открытые пространства западной и центральной части Палеарктики к югу от лесной зоны, еще в начале XIX в. был выделен в отдельный подвид *C. l. campestris* Dwigubski, 1804. По сравнению с лесным степной волк мельче, окраска более светлая, в восточной части ареала с примесью рыжих тонов. Существенных морфологических и анатомических различий с другими подвидами не выявлено, скорее это были признаки морфотипа/экотипа. Ареал степного волка включает степи Предкавказья, Нижнего Поволжья, Прикаспия, Приуралья, Западной Сибири, Казахстана и Средней Азии [2]. На востоке ареал степного волка охватывает север Монголии и Внутреннюю Монголию (Китай). Считается, что с севера степной волк контактирует с лесным, или обыкновенным, волком (*C. l. lupus* s.l.), а с юго-запада — с кавказским (прикаспийским) *C. l. cubanensis* (подвид, ныне признаваемый в основном лишь некоторыми териологами стран бывшего СССР). В Средней Азии и Казахстане степной волк контактирует на юге с признаваемым далеко не всеми специалистами пустынным волком *C. l. desertorum*, а на юго-востоке (и юге, если не выделять волка пустынного в подвид) — с монгольским (тибетским), *C. l. chanco*. Насколько глубоки генетические различия между этими подвидами — вопрос крайне сложный, как спорно и то, могут ли данные по отдельным генетическим маркерам являться основанием для поддержки или отрицания подвидового статуса. Так, под сомнение было поставлено и выделение сразу нескольких подвидов палеарктических волков — *C. l. chanco*, *C. l. desertorum*, *C. l. cubanensis* и собственно степного волка *C. l. campestris*, которые было предложено ввести в синонимию обыкновенного (лесного, евразийского) *C. lupus lupus* [9, 10]. В настоящее время доминирует точка зрения, согласно которой все эти подвиды являются слабо дивергировавшими подгруппами бореальной ветви евразийского волка, хотя в отношении тибетского/монгольского волка, распространенного от Каспия до Тибета и на восток до тихоокеанского побережья Китая, подвидовой статус обычно сохраняется. В то же время на юге Азии, где ареал волка в XX в. оказался фрагментированным, выделяются не только подвиды (азиатский, или индийский волк *C. l. pallipes*, аравийский *C. l. arabs* [11]), но и, в частности на индийском субконтиненте, новые виды, например гималайский (*C. himalayaensis*) и индийский (*C. indica*) волки, которые считаются одними из наиболее древних в Евразии на основании изменчивости их мтДНК [12, 13]. В то же время более

поздние исследования с помощью мтДНК [14] показали близость северо- и восточноазиатских волков, а не гималайских, к плейстоценовым, и в целом крайне сложную и запутанную филогенетическую картину, по крайней мере по последовательностям контрольного региона мтДНК. Тем не менее примеры “дробительского” подхода к внутривидовой систематике палеарктического с выделением не только множества подвидов у внутривидовых рас волка сохранились до недавнего времени [7]. Очевидно, что вопрос далек от разрешения, и пути дальнейших исследований лежат в области использования молекулярно-генетических маркеров и геномных подходов [15–17]. Крайне интересны и важны исследования ископаемых и субфоссильных волков и собак [18], при изучении современного генетического разнообразия волка много внимания уделяется событиям плейстоцена и их влиянию на происхождение рецентных форм, в том числе и в Сибири [19].

Однако при анализе дифференциации степного волка нужно учесть, что не меньший, чем палеогеография, след в генетической структуре популяций должен был оставить антропогенный пресс. В советский период истории волк открытых пространств как на севере, в тундре, так и на юге от лесной зоны, в степи, оказался более уязвим, чем лесной волк, поскольку с развитием технических средств, применяемых для борьбы с ним, таких как автотранспорт, вертолеты, а также яды, в степях стало возможным добывать тысячи и даже десятки тысяч особей хищника в год [2, 20, 21]. Кроме того, с освоением целинных земель степной зоны юга РСФСР и Казахстана, особенно в послевоенное время, задача регулирования популяций волка была признана важнейшей в государственном масштабе для достижения целей снижения прямого ущерба от хищничества волка для сельского и охотничьего хозяйства [22].

Наиболее обширная часть ареала степного волка сохранилась до настоящего времени на территории Республики Казахстан [22, 23], где после периода тотальной борьбы с волком в Казахской ССР численность волка стабилизировалась на более низком, но в целом достаточно высоком, уровне. Одной из проблем, которая требует исследования популяционно-генетическими методами, является выявление автохтонного генетического субстрата и возможных мигрантов из потенциальных донорских популяций, которыми для волка Казахстана можно признать как группировки горно-лесного волка Алтая, так и степных и пустынных волков Средней Азии, Китая и Монголии.

Оценка современного состояния генофонда степного волка может не только дать ответ на вопрос о его статусе, происхождении, но и практических путях регулирования его численности и снижения накала конфликта с человеком. Пони-

мание того факта, что экономический вред от волка не абсолютен, а его воздействие на популяции диких животных и степные экосистемы в целом имеет и обратную сторону – повышение их адаптивной устойчивости, в целом пришло [2, 20–29]. Тем не менее популяционно-генетических исследований, основанных на массовом материале из типовых местообитаний степного волка в России и Казахстане, до настоящего времени не проводилось. В наших предыдущих работах по волку Алтая [26] и Сибири [30] на основе изменчивости шести микросателлитных локусов мы показали в целом достаточно слабо выраженную дифференциацию на изученной части ареала, однако основные популяционные группировки волка в Сибири имеют некоторую географическую локализацию, в которой степной волк из номинативных местообитаний юга Сибири (Алтайский край, Бурятия) оказался в значительной степени перемешан с лесным.

Целью настоящей работы было изучение уровня генетического разнообразия и паттернов дифференциации по расширенной панели ядерных микросателлитных локусов популяционных группировок волка, обитающего в степной зоне Российской Федерации и Республики Казахстан в сравнении с соседними регионами лесной и горно-лесной зон европейской части России, Приуралья, Сибири и Казахстана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика биологического материала

Материал для популяционно-генетического анализа представлен высушенными фрагментами шкур или фиксированными тканями мышц или внутренних органов волка, сбор которых проводился в ходе государственных мероприятий по регулированию численности вида в России и Казахстане. Образцы из Республики Казахстан собраны автором (С.В. Леонтьев), биоматериал из регионов России прислан по запросу из региональных охотуправлений и предоставлен для настоящего исследования ФГБУ “Центрохотконтроль”/ФГБУ “Федеральный центр развития охотничьего хозяйства” (А.Я. Бондарев, А.В. Давыдов, П.М. Павлов). Всего было исследовано 326 особей из 16 регионов России и Казахстана. Для определенных видов анализа образцы из выборок также были отнесены к “макрорегиону” на основе места происхождения образца (табл. 1).

Выделение ДНК и проведение ПЦР

Выделение тотальной ДНК от волков с территории РФ проводили наборами DNeasy Blood & Tissue Kit компании “QiaGen” или ДНК-Экстран 2 компании “Синтол” в соответствии с протоколами производителя. При выделении ДНК набо-

рами ДНК-Экстран 2 после проведения лизиса дополнительно удаляли из супернатанта липиды четыреххлористым углеродом. К лизату добавляли 300 мкл CCl_4 , перемешивали на вортексе, центрифугировали одну минуту при 3000 об./мин, после чего полученный супернатант, содержащий раствор ДНК, переносили в чистые пробирки. Дальнейшее выделение проводили в соответствии с протоколом производителя. ДНК от волков, добытых охотниками по лицензиям на территории Казахстана, выделялась на базе Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина с помощью наборов для выделения Qiagen Blood and Tissue DNA Extraction Kit (Qiagen, США). Для проверки качества выделенных препаратов ДНК использовали электрофорез в агарозном геле с визуализацией в УФ-свете после окраски бромистым этидием.

Генотипирование изначально проводилось по 31 аутосомному микросателлитному локусу [31] (табл. 2), сборку ПЦР-реакций проводили отдельно для каждой из четырех мультиплексных смесей праймеров (1a,b; 2a,b; 3a,b; 4a,b), однако в отличие от оригинального протокола для амплификации использовали мастер-миксы GenPak™ PCRCore (ООО “Лаборатория Изоген”, Москва, Россия). Режимы амплификации не отличались от рекомендованных в статьях, где описаны соответствующие праймеры [32–34, 36, 39]. После амплификации ПЦР-продукты хранили при $-20^{\circ}C$ (кратковременно при $2-8^{\circ}C$). Для проверки амплификации специфического ПЦР-продукта и его качества использовали электрофорез в полиакриламидном геле.

Перед фрагментным анализом образцы объединялись в четыре смеси (меченные разными цветовыми метками) в соотношении по 1 мкл мультиплексов а и b каждой реакции и 13 мкл воды milli-Q. Фрагментный анализ проводился с помощью капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторах компании “Синтол” (Москва, Россия).

Считывание и обработка результатов

Считывание результатов фрагментного анализа и получение первичных матриц генотипов проводили в программе STRand v2.4.110 [40]. В качестве дополнительного программного обеспечения использовали пакет Fragment v1.0.9 для среды R [41]. Матрицы многолокусных генотипов предварительно обрабатывали с помощью макроса GenAl-Ex v6.503 [42], работающего на базе электронной таблицы MS Excel. Так как фрагментный анализ исследуемых образцов проводился в разных партиях и на разных приборах, для установления соответствия аллелей была проведена полокусная компенсация погрешности прибора на основании данных о частотах аллелей. Кроме того, некоторые образцы из предыдущих партий фрагментного ана-

Таблица 1. Географическое происхождение материала и распределение по группам

Регион	Изначальное количество образцов	Количество образцов, вошедших в анализ
Степи и лесостепи европейской части РФ (EurStRu)		
Республика Калмыкия	12	8
Ростовская область	3	3
Ставропольский край	69	43
Кавказский регион РФ (Cau)		
Республика Адыгея	10	8
Кабардино-Балкарская Республика	5	4
Республика Чечня	12	8
Леса Приуралья, РФ (ForUr)		
Пермский край	43	35
Запад Казахстана (KzW)		
Актюбинская область	16	16
Западно-Казахстанская область	9	7
Атырауская область	12	11
Костанайская область	13	8
Тургайский регион*	13	13
Восток Казахстана (KzE)		
Восточно-Казахстанская область	6	6
Карагандинская область	30	24
Леса Западной Сибири, РФ (ForSib)		
Тюменская область	12	10
Республика Алтай	61	52

* Территории бывшей Тургайской области, в настоящее время входящие в состав Акмолинской и Костанайской областей.

лиза переставлялись в следующие эксперименты в качестве реперных. Лocusы, для которых изменчивость, связанная с погрешностью прибора, осталась выше, чем изменчивость, обусловленная популяционными процессами, были исключены из анализа. Также были исключены locusы и особи с большим количеством отсутствующих данных.

В связи с особенностями получения материала — от особей, добытых охотниками, в коллекции потенциально присутствовало большое число близкородственных особей (так как волков часто добывают семьями). Родство не всегда указано в сопроводительной информации, поэтому мы проверили его сами, чтобы исключить потенциальных близких родственников из анализа. Так как большое количество близкородственных особей может внести погрешность в популяционный анализ, было принято решение исключить близкородственных особей. Для этого использовался пакет Demerelate для среды R [43]. Определение индекса родства проводили по [44]. Далее из пар волков с индексом родства >0.5 удаляли либо особь с большим количеством отсутствующих данных, либо случайную особь. Если одна из осо-

бей в паре уже была удалена, то вторая особь автоматически оставалась в анализе.

Также проводилась проверка на присутствие в locusах нуль-аллелей. Для этого использовали три независимых теста: проверка присутствия отклонения от равновесия Харди–Вайнберга для каждого locusа в каждом макрорегионе; проверка наличия отклонения индекса фиксации от нуля (рассчитано по χ^2) для каждого locusа как по макрорегионам, так и по совокупным данным; проверка присутствия нуль-аллеля для каждого locusа по макрорегионам. Первые два теста проводились в GenAlEx, для выявления и оценки частот нуль-аллелей использовалась программа Micro-Checker v2.2.3 [45]. Locusы, для которых все три теста дали положительный результат, были исключены из анализа.

Анализ популяционной структуры методами байесовского анализа проводили в программе Structure v2.3.4 [46–48] со следующими параметрами: длина периода “разогрева” (“burn-in”) — 10000; количество MCMC (Markov chain Monte Carlo) повторов после “разогрева” — 100000; модель наследования — “admixture”; число кластеров K —

1–12, число повторов для каждого $K = 5$, флаг UsePopInfo=0. На основе анализа генетической структуры проводился расчет наиболее вероятного числа исходных кластеров (K) при помощи метода Эванно [49] с использованием конвейерного веб-сервиса CLUMPAK [50]. Этот же веб-сервис использовался для получения совокупных результатов для каждого K . Для интерпретации выбиралось наиболее вероятное значение K , а также несколько соседних значений с близкими оценками вероятности по Эванно.

Для выделенных популяций GenAIEx были рассчитаны основные популяционно-генетические параметры: среднее число аллелей на локус – N_A ; число эффективных аллелей – N_E ; средняя наблюдаемая гетерозиготность – H_O ; средняя ожидаемая гетерозиготность – H_E ; внутривидовой индекс фиксации – F ; показатель межпопуляционной дифференциации – F_{ST} ; теоретическое число мигрантов между популяциями на поколение при наблюдаемом значении F_{ST} – N_m ; среднее число приватных (специфичных для популяции) аллелей – N_p .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Девять локусов были исключены из анализа из-за значительной погрешности прибора или большого количества пропущенных данных. Четыре локуса (2006, 2159, CXX.123 и АНТ126) исключены из-за того, что в них выявлены нуль-аллели, отклонения от равновесия Харди–Вайнберга и отклонения индекса фиксации от нуля. Для двух локусов (АНТ119 и 2201) наблюдалось присутствие нуль-аллеля во всех кластерах с частотами от 0.09 до 0.24, однако отклонение от Харди–Вайнберга и отклонение индекса фиксации от нуля наблюдали лишь в отдельных кластерах, в связи с чем было принято решение оставить их в анализе. Всего в итоговый набор анализируемых микросателлитов вошло 18 локусов: 2137, 2010, CXX.253, vWf, 2079, PEZ03, АНТ119, 2201, 2096, CXX.250, CXX.225, 2140, 2054, 2168, АНТ138, CXX.204, АНТ106, 2001.

В результате исключения близкородственных индивидуумов из анализа было удалено 70 особей. В итоговый анализ вошло 256 образцов. Изначальное число особей из разных регионов и итоговое число образцов, которые вошли в анализ, представлены в табл. 1.

Анализ внутривидовой изменчивости

Для анализа популяционно-генетических параметров выборки волка юга степной и лесостепной зон Европейской части России были объединены с кавказским регионом в единый макрорегион, так как анализ популяционной структуры показал, что

Таблица 2. Характеристики микросателлитных маркеров, используемых в исследовании

Локус	Число аллелей (по [31])	Источник
2010	5	[32]
2137	14	[32]
АНТ002	8	[33]
АНТ121	13	[34]
vWf	9	[35]
CXX.253	8	[36]
2079	5	[32]
MS41B	9	[37]
PEZ03	15	[38]
PEZ06	12	[38]
CXX.225	4	[36]
2096	5	[32]
2201	23	[32]
CXX.250	6	[36]
2006	5	[32]
2140	14	[32]
АНТ119	9	[34]
2054	8	[32]
2088	17	[32]
2168	14	[32]
АНТ004	4	[34]
CXX.20	5	[36]
2159	16	[32]
CXX.123	8	[36]
CXX.204	6	[36]
АНТ103	7	[34]
АНТ138	8	[34]
2001	8	[32]
АНТ101	12	[33]
АНТ106	15	[33]
АНТ126	11	[39]

они представляют собой единый кластер, а малое число особей в кавказском макрорегионе препятствует адекватному сравнению популяционно-генетических параметров с другими регионами.

Среднее число аллелей на локус по популяциям варьирует от 7.72 ± 0.57 на востоке Казахстана до 9.11 ± 0.63 на западе Казахстана (табл. 3). В этих же выборках наблюдаются крайние значения количества эффективных аллелей – 4.66 ± 0.34 и 5.47 ± 0.39 соответственно. Наибольшее число приватных аллелей выявлено в выборках лесного волка Сибири. В целом выявленный уровень аллельного разнообразия по микросателлитным ло-

Таблица 3. Оценки популяционно-генетических параметров в объединенных по регионам выборках волка по 18 микросателлитным локусам

Выборка	N	N_A	N_E	I	H_O	H_E	uH_E	F	N_p
EurStRu + Cau	73.11	8.77	4.88	1.73	0.68	0.77	0.78	0.114	6
	0.26	0.63	0.33	0.07	0.02	0.01	0.01	0.02	
ForUr	33.38	8.00	5.29	1.74	0.66	0.78	0.79	0.14	6
	0.44	0.67	0.48	0.08	0.02	0.02	0.02	0.03	
KzW	53.11	9.111	5.467	1.83	0.70	0.80	0.81	0.12	7
	0.51	0.63	0.39	0.07	0.01	0.01	0.01	0.02	
KzE	29.33	7.72	4.66	1.67	0.68	0.76	0.77	0.10	3
	0.25	0.57	0.34	0.07	0.03	0.01	0.01	0.03	
ForSib	60.88	8.94	4.97	1.73	0.69	0.77	0.77	0.09	12
	0.30	0.71	0.43	0.08	0.02	0.02	0.02	0.02	

Примечание. Верхняя строка – среднее, нижняя – ошибка. N – объем выборки; N_A – общее число аллелей; N_E – число эффективных аллелей; I – индекс Шеннона; H_O – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; uH_E – ожидаемая гетерозиготность с поправкой на размер выборки; F – внутривидовой индекс фиксации; N_p – среднее число приватных (специфичных для популяции) аллелей.

кусам был характерным для популяций волка, не прошедших “бутылочное горлышко”.

Наблюдаемая гетерозиготность варьирует между регионами лишь в небольшой степени – почти все значения находятся в рамках стандартной ошибки друг от друга с максимальной разницей между средними значениями по регионам, равной 0.04. Минимальные значения наблюдаются в лесах Приуралья (0.66 ± 0.02), максимальные – на западе Казахстана (0.70 ± 0.01). Разница между ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготностью во всех регионах составляет $\sim 0.1 \pm$ стандартная ошибка для данного региона. При этом минимальные значения ожидаемой гетерозиготности наблюдаются на востоке Казахстана – 0.76 ± 0.01 ; максимальные – на западе Казахстана – 0.80 ± 0.01 . Для популяции лесов востока России не наблюдается различий между значениями ожидаемой гетерозиготности, как без поправки на размер популяции, так и с ее учетом. В остальных популяциях средние значения с поправкой и без нее различаются на 0.01, что находится в рамках стандартной ошибки. Минимальные значения индекса фиксации наблюдаются в популяции лесов востока России – 0.09 ± 0.02 , максимальные – в лесах Приуралья – 0.14 ± 0.03 .

Число приватных аллелей в популяциях варьирует от трех на востоке Казахстана до 12 в лесах Сибири. При этом в остальных регионах наблюдается практически идентичное число приватных аллелей – 6 в лесах запада России и в лесах Приуралья и 7 на западе Казахстана.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что ни в одном из исследуемых районов не наблюдается какого-либо значительного снижения уровня внутривидовой изменчивости.

Анализ межпопуляционной подразделенности

Степень генетической подразделенности популяций волка в изученной части ареала на территории России и Казахстана оказалась невысокой ($F_{ST} = 0.029$). Анализ матрицы генетических дистанций между географическими популяциями (рис. 1) показал значительное расхождение друг от друга популяций трех регионов (Западного, лесного Приуралья и Восточного). Популяции Казахстана занимают промежуточное положение между выборками лесного волка Уральского и Восточного регионов и наиболее удалены от выборок запада России.

Методом Эванно было выявлено оптимальное число исходных кластеров $K = 6$. При рассмотрении меньших K можно выделить три крупных генетических кластера, внутри которых при больших значениях K выделяются более мелкие популяции (рис. 2). Эти три “макрокластера” имеют следующий состав:

1. Западный: степи и лесостепи Европейской части России, включая Кавказ, а также часть Тюменской области.
2. Уральский (данный кластер начинает выявляться уже при $K = 2$): леса Приуралья, а также

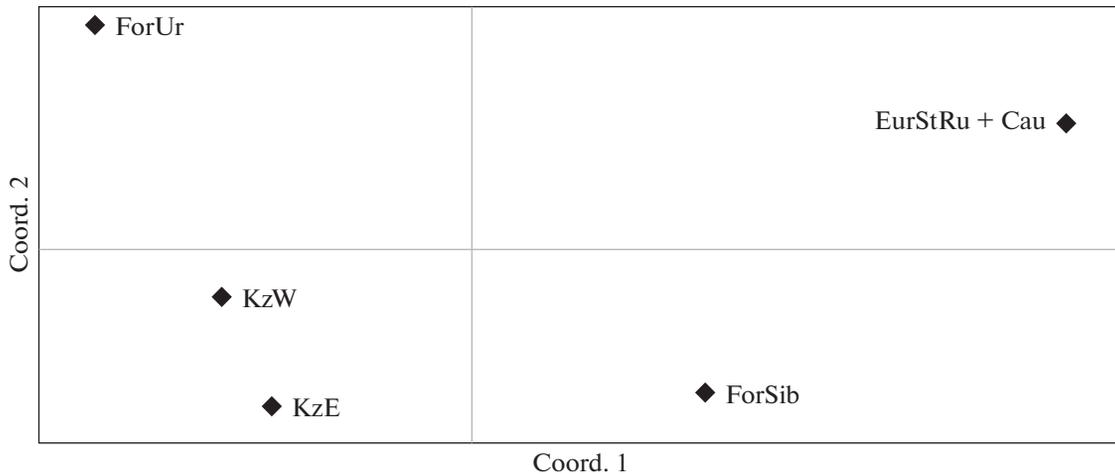


Рис. 1. Результаты многомерного анализа межпопуляционной дифференциации волка методом главных координат по матрице попарных генетических дистанций.

Тургайская, Актюбинская и частично Атырауская области Казахстана.

3. Восточный: леса Алтая, часть Тюменской области, Западно-Казахстанская, Костанайская и Карагандинская области.

Стоит отметить, что степные регионы, представленные в данном исследовании в основном территорией Казахстана, при $K = 3$ не обособляются.

При $K = 4$ происходит выделение нового кластера, присутствующего в основном в Тургайском регионе Казахстана и Тюменской области. При $K = 5$ происходит дробление Западного кластера – от него отделяется популяция Республики Калмыкия. При $K = 6$ происходит выделение нового кластера на территории Казахстана, присутствующего в основном в Западно-Казахстанской и Карагандинской областях.

При $K > 6$ выделения новых обособленных кластеров не происходит – наблюдается дробление кластера, ассоциированного с популяцией Калмыкии, на более мелкие фрагменты без значительного влияния на общую популяционную структуру. Начиная с $K = 10$, видимых изменений генетической структуры с увеличением K не наблюдается. Таким образом, можно говорить о том, что $K = 6$ в полной мере описывает межпопуляционную изменчивость в рамках данной работы.

При рассмотрении $K = 6$ с точки зрения экотипов можно отметить, в первую очередь, ярко выраженную генетическую идентичность лесных и европейских степных регионов – три “макрокластера”, выделившихся на малых значениях K , все еще занимают доминирующее положение в популяционной структуре. Со степными регионами

ассоциированы два кластера. Первый, приуроченный преимущественно к Тургайскому региону, выделяется уже на $K = 4$. Особи, принадлежащие к этому кластеру, присутствуют также в Актюбинской и Атырауской областях Казахстана, Тюменской, Ростовской областях и Ставропольском крае России. Второй степной кластер, ассоциированный в первую очередь с Западно-Казахстанской и Карагандинской областями Казахстана, выделяется только на $K = 6$, что может свидетельствовать о его меньшем уровне генетической обособленности. Особи, принадлежащие к данному кластеру, присутствуют также в Костанайской и Восточно-Казахстанской областях Казахстана, а также в Республике Алтай и Пермском крае.

Стоит отметить относительно высокую долю волков, относящихся к “лесным” кластерам, в выборках с территории Казахстана. Эти особи, вероятно, ассоциированы с регионами лесов и лесостепей или являются потомками мигрантов из лесных и горно-лесных ландшафтов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни внутривидовой генетической разнообразия в популяциях степного волка оказались высокими и близкими к наблюдаемым в соседних частях ареала и природных зонах. Таким образом можно сделать вывод о том, что если сокращение численности и повлияло на параметры внутривидовой генетической разнообразия, то не самым драматическим образом, или что генетическое разнообразие было восстановлено за счет миграции из соседних регионов, в пользу чего свидетельствует и наличие общих исходных кластеров многолокус-

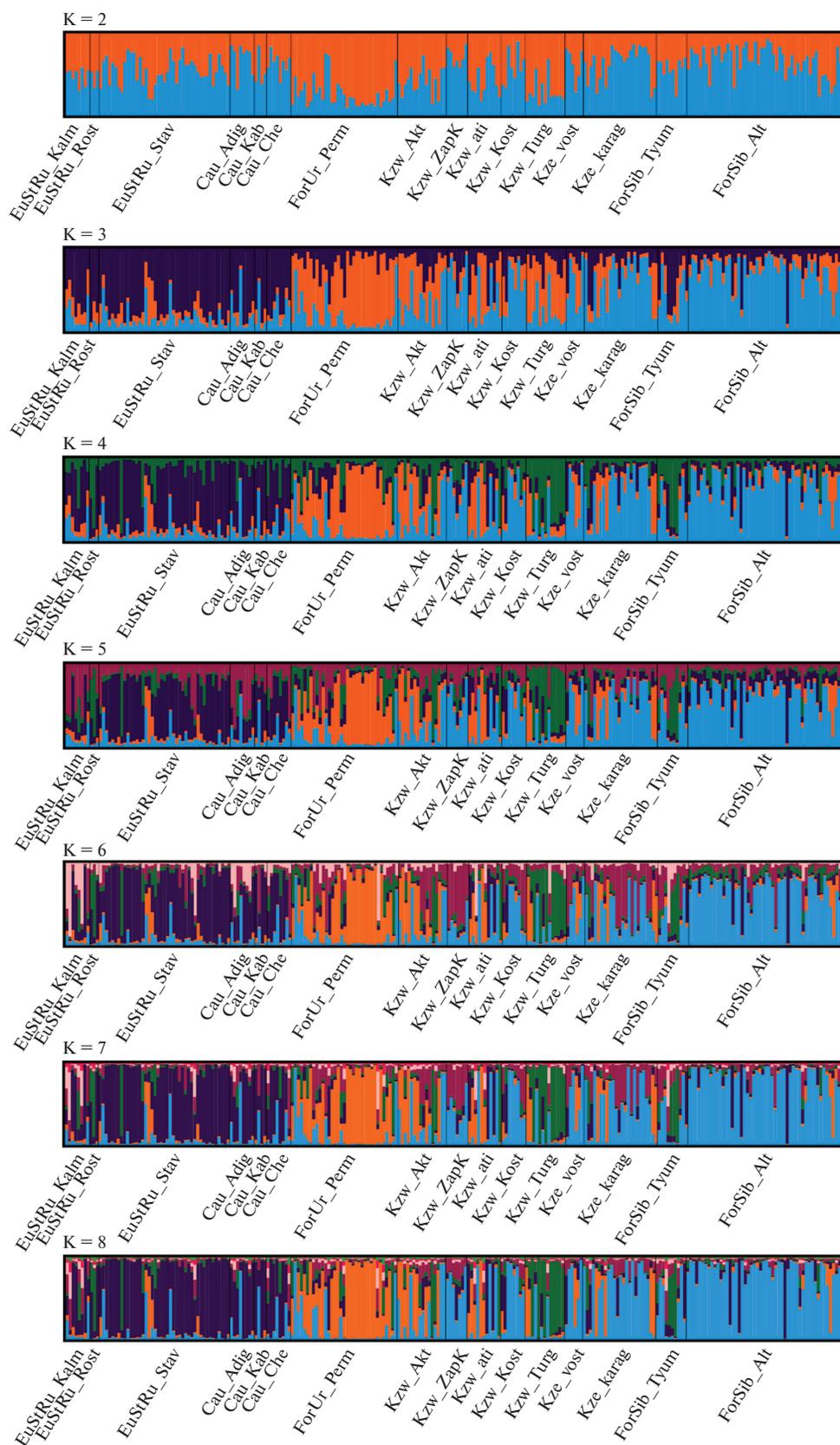


Рис. 2. Результаты анализа байесовской кластеризации особей волка в программе STRUCTURE.

ных генотипов у казахстанского, южнорусского и сибирского волков.

Анализ популяционной структуры демонстрирует значительное влияние окружающих регионов на популяции волка в Казахстане. Так, в западных областях, в частности в Актюбинской, наблюдается большое количество особей, относящихся к уральскому кластеру. В восточных и центральных регионах присутствует большое количество особей, относящихся к алтайскому кластеру. В обоих случаях наблюдаются как особи, практически целиком относящиеся к уральскому или алтайскому кластеру, так и их потомки с меньшей долей принадлежности к кластеру.

Влияние кавказского кластера на популяционную структуру Казахстана выражено значительно в меньшей степени — он представлен лишь отдельными особями. Тем не менее все еще наблюдается разнообразие доли принадлежности к кавказскому кластеру, что свидетельствует о присутствии как свежих мигрантов, так и их потомков.

Несмотря на такое существенное влияние со стороны российских популяций, в Казахстане присутствуют два генетических кластера, ассоциированных в первую очередь именно с территорией Республики, что свидетельствует о наличии на ее территории генетически обособленных популяционных группировок. При этом присутствие особей, относящихся к этим кластерам за пределами Казахстана, служит свидетельством двустороннего генетического обмена между популяциями Казахстана и сопредельных территорий. Об активном генетическом потоке между популяциями свидетельствуют также и высокие, сравнимые с популяциями РФ, популяционно-генетические параметры.

Численность и плотность популяции волка на открытых пространствах, в том числе в степи, потенциально выше, чем у таежного (лесного, горно-лесного) волка, что объясняется трудностями, которые он должен преодолевать в условиях большой высоты снежного покрова в лесу, затрудняющего передвижение и охоту [51]. Однако большая уязвимость волка перед человеком в тех же открытых биотопах приводит к некоторому балансу. При усилении пресса истребительных мероприятий волка в рамках программ регулирования его численности средняя плотность населения волка в степи снижается, однако в случае Казахстана, по видимому, предпринятые усилия не привели к “бутылочному горлышку”, т.е. не достигли эффекта коллапса, ведущего к генетическому обеднению. При том, что на пиках добычи волка, в 1953–1955 гг., в год уничтожалось до 13–21 тыс. особей, на спаде, во время и после Великой Оте-

чественной войны (например, 1942 г. — 2000 особей), в 1966 г. — 7875 волков — при том, что отстрел велся не так интенсивно, никогда не было падения до значений ниже 7 тыс. добытых зверей [22]. В 1971–1978 гг. на территории Казахской ССР добывалось от 7.4 до 9.9 тыс. особей, и эти оценки были ниже рассчитанной величины приплода. Для сравнения во всей Российской Федерации в настоящее время добывается в среднем около 10–11 тыс. волков в год [52]. Таким образом, демографические причины не могли вызвать генетического обеднения и, скорее всего, не вызвали.

Помимо репродукции автохтонного степного волка, другим важным фактором, который нужно рассмотреть в качестве поддерживающего и повышающего генетическое разнообразие популяции, является иммиграция из соседних регионов. Донорскими популяциями для степного волка Южной Сибири и Казахстана могли быть: с северо-запада — волк лесов и лесостепей Приуралья и Зауралья (*C. l. lupus*), с севера и северо-востока — горно-таежный волк Алтая и Саян *C. l. lupus* (или *C. l. altaicus*), с юга — пустынный волк Средней Азии *C. l. desertorum*, с востока — монгольский/тибетский подвид *C. l. chanco*. Мы можем отметить реальный вклад северных, сибирских кластеров в генетическую конституцию степного волка. Представительство у сибирско-казахстанского волка кластеров, характерных для степного волка популяций степей юга Европейской части РФ, невелико. Материал от пустынного и монгольского волка в нашем исследовании отсутствовал, и в связи с этим трудно судить о связях этих подвидов/эко-типов со степным. Можно лишь предполагать, что один из “автохтонных” кластеров, а именно выявленный в Карагандинской области, каким-то образом связан с этими подвидами. Что касается генетического субстрата местного степного волка, наши данные свидетельствуют о том, что, несмотря на иммиграцию, он сохранился и является одной из основ генофонда популяции волка Казахстана.

Дальнейшие исследования с привлечением данных по другим классам генетических маркеров и расширение географии выборок требуются для более детального анализа популяционно-генетической структуры степного волка.

Этические нормы обращения с животными не нарушались, ни одно животное не было добыто специально для данного исследования. Все образцы взяты от законно добытых особей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 18-04-01300, а также частично в рамках темы госзадания (ИОГен РАН) 0112-2019-0001.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pocock R.I.* The races of *Canis lupus* // Proc. Zool. Society London. 1935. V. 105. № 3. P. 647–686.
2. Волк. Происхождение, систематика, морфология, экология / Под ред. Бибикова Д.И. М.: Наука, 1985. 606 с.
3. *Огнев С.И.* Звери Восточной Европы и Северной Азии. М.: Изд-во АН СССР, 1931. 776 с.
4. *Wabakken P., Sand H., Kojola I. et al.* Multistage, long-range natal dispersal by a global positioning system-collared Scandinavian wolf // J. Wildlife Management. 2007. V. 71. № 5. P. 1631–1634. <https://doi.org/10.2193/2006-222>
5. *Гентнер В.Г., Наумов Н.П., Юргенсон Т.Б. и др.* Млекопитающие Советского Союза. Т. 2. Ч. 1. Морские коровы и хищные. М.: Высш. шк., 1967. С. 123–193.
6. *Суворов А.П., Смирнов М.Н.* О подвидовом положении алтайского горно-таежного волка (*Canis lupus altaicus*) // Тр. Тигирекского заповедника. 2005. № 1. С. 247–350.
7. *Суворов А.П., Кириенко Н.Н.* К вопросу о внутривидовом полиморфизме волка (*Canis lupus*), обитающего на территории России // Вестник Красноярского гос. аграрного ун-та. 2008. № 3. С. 6.
8. *Бондарев А.Я.* Морфологическая характеристика волка (*Canis lupus*) Западной и Средней Сибири // Вестник Алтайского гос. аграрного ун-та. 2012. Т. 87. № 1. С. 30–34.
9. *Bush R.H.* The Wolf Almanac. N.Y.: Lyons & Burford, 1993. 256 p.
10. *Pilot M., Greco C., vonHoldt B.M. et al.* Genome-wide signatures of population bottlenecks and diversifying selection in European wolves // Heredity. 2014. V. 112. № 4. P. 428–442. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.122>
11. *Bray T.C., Mohammed O.B., Butynski T.M. et al.* Genetic variation and subspecific status of the grey wolf (*Canis lupus*) in Saudi Arabia // Mamm. Biology. 2014. V. 79. № 6. P. 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2014.06.005>
12. *Aggarwal R.K., Kivisild T., Ramadevi J., Singh L.* Mitochondrial DNA coding region sequences support the phylogenetic distinction of two Indian wolf species // J. Zool. Syst. and Evol. Research. 2007. V. 45. № 2. P. 163–172. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2006.00400.x>
13. *Sharma D.K., Maldonado J.E., Jhala Y.V., Fleischer R.C.* Ancient wolf lineages in India // Proc. Royal Soc. London. Series B—Biol. Sciences. 2004. V. 271. P. S1–S4.
14. *Ersmark E., Klutsch C.F.C., Chan Y.L. et al.* From the past to the present: Wolf phylogeography and demographic history based on the mitochondrial control region. // Frontiers Ecol. Evol. 2016. V. 4. P. 1–12 <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00134>
15. *Hindrikson M., Remm J., Pilot M. et al.* Wolf population genetics in Europe: A systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management // Biol. Reviews. 2017. V. 92. № 3. P. 1601–1629. <https://doi.org/10.1111/brv.12298>
16. *vonHoldt B.M., Pollinger J.P., Earl D.A. et al.* A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids // Genome Res. 2011. V. 21. № 8. P. 1294–1305. <https://doi.org/10.1101/gr.116301.110>
17. *vonHoldt B.M., Stahler D.R., Bangs E.E. et al.* A novel assessment of population structure and gene flow in grey wolf populations of the Northern Rocky Mountains of the United States // Mol. Ecol. 2010. V. 19. № 20. P. 4412–4427. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04769.x>
18. *Ovodov N.D., Crockford S.J., Kuzmin Y.V. et al.* A 33,000-year-old incipient dog from the Altai Mountains of Siberia: Evidence of the earliest domestication disrupted by the last glacial maximum // PLoS One. 2011. V. 6. № 7. P. 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022821>
19. *Ramos-Madrigal J., Sinding M.-H.S., Carøe C.* Genomes of Pleistocene Siberian wolves uncover multiple extinct wolf lineages // Curr. Biology. 2021. V. 31. № 1. P. 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.10.002>
20. *Леонтьев С.С.* Состояние волка как биологического ресурса в Казахстане // Вестник НГАУ. 2018. № 1. С. 80–87.
21. *Леонтьев С.В., Бербер А.П.* Оценка состояния биологического ресурса волка в Казахстане // Вестник охотоведения. 2018. Т. 15. № 2. С. 90–98.
22. *Федосенко А.К., Слудский А.А.* Волк – *Canis lupus* Linnaeus, 1758 // Млекопитающие Казахстана. Т. 3. Ч. 1. Алма-Ата: Наука, 1981. С. 8–56.
23. *Федосенко А.К.* Волки. Алма-Ата: Кайнар, 1986. 95 с.
24. *Бондарев А.Я.* О принципах регулирования численности волка // Вестник Алтайского гос. аграрного ун-та. 2012. № 9(95). С. 70–71.
25. *Бондарев А.Я.* Волки Западной Сибири: численность, распределение и загрязненность. М.: ФГБУ “Центрохотконтроль”, 2013. 248 с.
26. *Бондарев А.Я., Воробьевская Е.А., Политов Д.В.* О генетической дифференциации волка Сибири // Вестник АГАУ. 2013. Т. 9. № 107. С. 49–57.
27. *Бондарев А.Я., Дёжкин А.В., Павлов П.М.* Регулирование популяций волка: проблемы и решения // Териофауна России и сопредельных территорий. X съезд Териологического общества при РАН. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2016. С. 52.

28. Леонтьев С.В. Об изменении плотности населения волков на степной территории Казахстана // Современные проблемы охотничьего хозяйства Казахстана и сопредельных стран: Материалы Международн. научно-практ. конф. Алматы, 2014. С. 174–177.
29. Леонтьев С.В. Питание и роль волка в природе и сельском хозяйстве Казахстана // Инновации в продовольственной безопасности. 2017. Т. 4(18). С. 107–118.
30. Талала М.С., Бондарев А.Я., Захаров Е.С., Политов Д.В. Генетическая дифференциация популяций волка *Canis lupus* L. Сибири по микросателлитным локусам // Генетика. 2020. Т. 56. № 1. С. 67–77. <https://doi.org/10.1134/S0016675820010129>
31. Åkesson M., Liberg O., Sand H. et al. Genetic rescue in a severely inbred wolf population // Mol. Ecol. 2016. V. 25. № 19. P. 4745–4756. <https://doi.org/10.1111/mec.13797>
32. Francisco L.V., Langston A.A., Mellersh C.S. et al. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping // Mammal. Genome. 1996. V. 7. № 5. P. 359–362. <https://doi.org/10.1007/s003359900104>
33. Holmes N.G., Dickens H.F., Parker H.L. et al. Eighteen canine microsatellites. Two polymorphic bovine microsatellite loci // Animal Genetics. 1995. V. 26. № 2. P. 132–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1995.tb02659.x>
34. Holmes N.G., Mellersh C.S., Humphreys S.J. et al. Isolation and characterization of microsatellites from the canine genome // Animal Genetics. 1993. V. 24. № 4. P. 289–292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1993.tb00313.x>
35. Shibuya H., Collins B.K., Huang T.H.M., Johnson G.S. A polymorphic (AGGAAT)_n tandem repeat in an intron of the canine von Willebrand factor gene // Animal Genetics. 1994. V. 25. № 2. P. 122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1994.tb00094.x>
36. Ostrander E.A., Sprague G.F., Rine J. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog // Genomics. 1993. V. 16. № 1. P. 207–213. <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1160>
37. Sundqvist A.K., Ellegren H., Olivier M., Vilà C. Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers // Mol. Ecol. 2001. V. 10. № 8. P. 1959–1966. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01326.x>
38. Neff M.W., Broman K.W., Mellersh C.S. et al. A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris* // Genetics. 1999. V. 151. № 2. P. 803–820. <https://doi.org/10.1093/genetics/151.2.803>
39. Holmes N.G., Strange N.J., Binns M.M. et al. Three polymorphic canine microsatellites // Animal Genetics. 1994. V. 25. № 3. P. 200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1994.tb00122.x>
40. Toonen R.J., Hughes S. Increased throughput for fragment analysis on an ABI PRISM 377 automated sequencer using a membrane comb and STRand software // Bio-Techniques. 2001. V. 31. № 6. P. 1320–1324.
41. Covarrubias-Pazarán G., Diaz-García L., Schlautman B. et al. Fragman: An R package for fragment analysis // BMC Genetics. 2016. V. 17. № 1. P. 62. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0365-6>
42. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. № 1. P. 288–295. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
43. Kraemer P., Gerlach G. Demerelate: Calculating inter-individual relatedness for kinship analysis based on dominant diploid genetic markers using R // Mol. Ecol. Resour. 2017. V. 17. P. 1371–1377. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12666>
44. Blouin M.S., Parsons M., Lacaille V., Lotz S. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness // Mol. Ecol. 1996. V. 5. № 3. P. 393–401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1996.tb00329.x>
45. Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. № 3. P. 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
46. Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies // Genetics. 2003. V. 164. № 4. P. 1567–1587. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>
47. Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information // Mol. Ecol. Resour. 2009. V. 9. № 5. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>
48. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. Issue 2. P. 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
49. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study // Mol. Ecol. 2005. V. 14. № 8. P. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
50. Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M. et al. Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // Mol. Ecol. Resour. 2015. V. 15. № 5. P. 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
51. Формозов А.Н. Роль снежного покрова в жизни млекопитающих и птиц // Материалы к познанию фауны и флоры СССР. М.: МОИП, 1946. С. 47–49.
52. Дёжкин А.В., Данилкин А.А., Кузякин В.А. Концептуальные основы рационального ресурсопользования в охотничьем хозяйстве России // Государственное управление ресурсами. Спец. выпуск “Охота и охотничьи ресурсы Российской Федерации”. 2011. С. 332–339.

Population Genetic Structure of the Steppe Wolf of Russia and Kazakhstan by Microsatellite Loci

P. A. Kazimirov^{a, *}, S. V. Leontyev^{b, c}, A. V. Nechaeva^a, M. M. Belokon^a,
Yu. S. Belokon^a, A. Ya. Bondarev^d, A. V. Davydov^d, and D. V. Politov^{a, **}

^aVavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bS. Seyfullin Kazakh Agrotechnical University, Nur-Sultan, 010011 Republic of Kazakhstan

^cNovosibirsk State Agricultural University, Novosibirsk, 630039 Russia

^dFederal Center for Hunting, Moscow, 105118 Russia

*e-mail: farenklaw@gmail.com

**e-mail: dmitri_p@inbox.ru

A population genetic study of the wolf, *Canis lupus* Linnaeus, 1758 in Russia and Kazakhstan was carried out with a focus on the origin, state of the gene pool and the status of the steppe wolf (nominative subspecies *C. l. campestris*). Using the analysis of 18 nuclear microsatellite loci, it was shown that the level of intrapopulation genetic diversity of the steppe wolf of Kazakhstan is quite high, the allelic and genetic diversity is comparable with the populations of the steppe wolf in other regions (plains of the European South of Russia) and forest and mountain-forest ecotypes inhabiting the Caucasus, the Urals and Western Siberia. An analysis of the differentiation of the studied samples in the STRUCTURE program allows us to conclude that the steppe wolf gene pool contains both a local cluster of genotypes and immigrants from neighboring territories adjacent to the steppe from the north. The possible impact of anthropogenic pressure in the form of population regulation in the Soviet and post-Soviet times and subsequent recolonization from surrounding donor populations is discussed.

Keywords: wolf, *Canis lupus*, steppe subspecies, genetic diversity, population genetic structure, DNA, microsatellites.

СООТНОШЕНИЕ ПОЛОВ В ПОТОМСТВЕ МОНОГАМНОГО
ВИДА ПТИЦ – КРАСАВКИ *Anthropoides virgo*© 2022 г. Е. А. Мудрик¹, *, Е. И. Ильяшенко², К. А. Постельных³,
О. А. Горошко^{4, 5}, Д. В. Политов¹¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия²Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119011 Россия³Питомник редких видов журавлей Окского государственного природного биосферного заповедника,
Рязанская обл., Брыкин Бор, 391072 Россия⁴Государственный природный биосферный заповедник “Даурский”,
Забайкальский край, Нижний Цасучей, 674495 Россия⁵Институт природных ресурсов, экологии и криологии Сибирского отделения
Российской академии наук, Чита, 672014 Россия

*e-mail: mudrik@vigg.ru

Поступила в редакцию 16.05.2022 г.

После доработки 20.06.2022 г.

Принята к публикации 21.06.2022 г.

С использованием молекулярно-генетического маркера пола EE0.6 установлен пол 155 птенцов моногамного вида птиц – журавля красавки (*Anthropoides virgo* Linnaeus, 1758) из азово-черноморской, прикаспийской, волго-уральской, зауральской, алтайской, хакасской и забайкальской гнездовых группировок. Показано, что полные выводки с двумя птенцами, представленными самцом и самкой, встречались чаще, чем выводки с двумя птенцами одного пола. Выводки, в которых оба птенца являлись самками, преобладали над выводками из двух птенцов-самцов, хотя различия были статистически незначимы. Всего из 155 птенцов определено 69 самцов и 86 самок. Из 112 птенцов в полных выводках самцами являлись 48 особей, самками – 64. Несмотря на тенденцию преобладания самок среди птенцов в общей выборке и в большинстве гнездовых группировок, соотношение самцов и самок в потомстве красавки в целом (0.445, $P = 0.181$) и в полных выводках (0.429, $P = 0.174$) было паритетным, что отражает адаптивную и репродуктивную стратегию этого моногамного вида птиц с большой продолжительностью жизни.

Ключевые слова: журавль, молекулярно-генетическое определение пола, самец, самка, птенец, выводок, гнездовая группировка, EE0.6.

DOI: 10.31857/S0016675822110078

Соотношение полов – важная характеристика популяционной демографии, системы скрещивания и адаптивной стратегии организмов, размножающихся половым путем. Согласно классической теории Фишера [1] равное количество самцов и самок в популяциях животных является оптимальным и поддерживается отбором, однако у многих видов могут наблюдаться сдвиги в равновесии полов на разных этапах их индивидуального развития. К птицам данная теория также применима со многими допущениями ввиду особенностей их физиологии и образа жизни [2]. Соотношение полов в потомстве птиц может смещаться в сторону преобладания самцов или самок при оплодотворении (первичное соотношение), на момент вылупления птенцов (вторичное соотношение) и при достижении ими половой зрелости (третичное соотношение) [3]. Первичное со-

отношение во многом зависит от массы тела и гормонального состояния организма матери [4–6] и выбора самкой наиболее перспективного партнера для размножения [7, 8]. Возраст, репродуктивный опыт, продолжительность жизни, степень биологического родства, энергетические затраты родителей и условия среды определяют вторичное соотношение полов у птиц [9, 10]. Третичное соотношение непосредственно обусловлено смертностью половозрелых особей и не связано с первичным и вторичным соотношениями [11]. В целом соотношение взрослых самцов и самок у позвоночных животных с генетической детерминацией пола имеет тенденцию к преобладанию гомогаметного пола (которым у птиц являются самцы) из-за возможной экспрессии вредных рецессивных генов у гетерогаметных особей (в случае с птицами – у самок) [10, 12–14].

Отклонения в первичном и вторичном соотношениях полов чаще всего встречаются у полигамных видов птиц с большими кладками яиц [10]. Однако феномен управления и регулирования пола потомства родителями описан у многих видов птиц [15–17]. Представители всех видов журавлей являются моногамными птицами с большой продолжительностью жизни и репродуктивного периода, у которых заботу о потомстве выполняют оба родителя. Как правило, у таких видов соотношение полов в потомстве должно быть близким к равному [10], однако экспериментальные данные для природных популяций журавлей по этому вопросу отсутствуют.

Красавка (*Anthropoides virgo* Linneaus, 1758) – это мигрирующий вид журавлей, размножающийся в степной и полупустынной зонах Евразии от юга Украины до севера Китая, мировая численность которого постепенно снижается [18, 19]. Гнездовая часть ареала красавки в Европе в основном находится на территории России, где выделяют азово-черноморскую, прикаспийскую и волго-уральскую группировки [20]. Азиатская часть гнездовой ареала красавки значительно больше европейской и преимущественно расположена в Казахстане, Монголии и Китае, а северная граница распространения вида проходит по южным рубежам России – от Зауралья через Южную Сибирь до Прибайкалья и Забайкалья. В России красавка занесена в Красную книгу как сокращающийся в численности и распространении вид [19]. Выделение гнездовых группировок в азиатской части ареала в соответствии с описанием их пролетных путей не завершено, на российской территории к настоящему времени выделяются зауральская, алтайская, хакасская и забайкальская группировки [21]. Как и у других видов журавлей, кладка красавки состоит из двух яиц. Птенцовая конкуренция у красавок отсутствует, поэтому оба потомка имеют шансы выжить и достичь репродуктивного возраста. При анализе репродуктивной стратегии и системы скрещивания видов очень важны знания о механизмах поддержания оптимального соотношения полов, что является необходимым для сохранения высокой эффективной численности популяций [22].

Цель работы – анализ соотношения полов в потомстве красавки в природе в разных гнездовых группировках на основе молекулярно-генетического определения пола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал

В качестве биологического материала использовали растущие покровные перья из оперения груди у отловленных ручным способом птенцов красавки 14–40-дневного возраста, в котором они

еще не обладают способностью к полету. Материал был собран от 155 птенцов в ходе собственных экспедиций в места гнездования красавки азово-черноморской, прикаспийской, волго-уральской, зауральской, алтайской, хакасской и забайкальской группировок в течение трех сезонов размножения 2017–2019 гг. Количество проанализированных выводков и птенцов из каждой гнездовой группировки дано в табл. 1. Отлов птенцов, забор биоматериала (1–2 пера от особи) и последующий выпуск птенцов в природу проводили в соответствии с разрешениями Федеральной службы по надзору в сфере природопользования (Росприроднадзора) № 104, 105 и 106 от 2017 г.; № 52 и 56 от 2018 г.; № 9 и 60 от 2019 г. Растущие перья помещали в пробирки 1.5 мл типа Эппендорф с 95%-ным этанолом или раствором Лонгмайра [23], которые хранились при комнатной температуре до момента их транспортировки в лабораторию, а затем в морозильной камере на –20°C.

Выделение ДНК и молекулярно-генетическое определение пола

Экстракцию ДНК из растущих перьев осуществляли с помощью наборов для выделения ДНК DIAAtom™ DNAPrep100 Kit (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия) и К-сорб (НПК “Синтол”, Россия) по протоколам производителей. Полученную геномную ДНК использовали для последующей ПЦР-амплификации сцепленной с полом последовательности W-хромосомы EE0.6 [24] с применением комбинации праймеров AWS05/NRD4 (5'-CACCCCTGGATTGGACAACCTATTTC-3'; 5'-TCAGAGCACTCTTTCCAGGAA-3') и SINT-F/SINT-R (5'-TAGGCTGCAGAATACAGCAT-3'; 5'-TTGTGCAGTTCTAGTCCATA-3') [25], протестированной нами ранее на красавках [26, 27]. Для проведения ПЦР использовали набор реагентов GenPak® PCR Core (ООО “Лаборатория Изоген”) и ДНК-амплификатор Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, США). ПЦР-амплификация включала первичную денатурацию при 94°C – 5 мин; 30 циклов, состоящих из денатурации при 94°C – 50 с, отжига праймеров при 57°C – 50 с и элонгации при 72°C – 50 с; и финальную элонгацию при 72°C – 10 мин. Продукты амплификации идентифицировали путем электрофоретического разделения в 1.5%-ном агарозном геле в буферной системе TAE с последующим окрашиванием геля бромистым этидием и визуализацией в ультрафиолетовом свете с помощью системы гель-документации Kodak Edas 290 (США). В электрофоретическом профиле самцов на геле идентифицировали один фрагмент ДНК размером 150 пн, самок – два фрагмента ДНК размерами 150 и 300 пн [26, 28]. В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали 1 Kb ДНК-маркер (ООО “СибЭнзайм”, Россия).

Таблица 1. Количество неполных и полных выводков, а также общее количество изученных птенцов в разных гнездовых группировках красавки (*Anthropoides virgo*)

Выводки	Гнездовые группировки							Всего
	азово-черноморская	прикаспийская	волго-уральская	зауральская	алтайская	хакасская	забайкальская	
Один самец	2	12	2	1	1	1	2	21
Одна самка	4	9	2	4	1	—	2	22
Два самца	2	3	2	—	—	—	1	8
Две самки	3	8	—	2	1	1	1	16
Самец и самка	4	9	10	1	2	2	4	32
Количество выводков	15	41	16	8	5	4	10	99
Количество птенцов	24	61	28	11	8	7	16	155

Статистический анализ

Соотношение полов среди всех птенцов определяли как долю самцов по отношению к общему количеству птенцов [29] в потомстве разных гнездовых группировок и в целом в популяции красавки. Соотношение полов в выводках определяли как долю самцов в полных выводках, представленных двумя птенцами. Сравнение выборок самцов и самок осуществляли с помощью точного теста Фишера для выборок малого размера с нуль-гипотезой о соотношении полов 1 : 1; расчеты проводили в модуле COMPARE2 программы WINPEPI [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из 99 проанализированных выводков красавки в семи гнездовых группировках 56 выводков были полными (т.е. с двумя птенцами) и 43 выводка состояли из одного птенца (табл. 1). Количество выводков, в которых единственный птенец был самцом или самкой, как в каждой гнездовой группировке, так и во всей популяции (21 и 22 выводка с самцами и самками соответственно) достоверно не отличалось от паритетного (0.488, $P = 0.585$ в целом в популяции). В 56 полных выводках разнополые выводки (32) недостоверно преобладали над однополыми (24). Полных однополых выводков с двумя самками (16) было вдвое больше, чем с двумя самцами (8), что, однако, также статистически незначимо.

В потомстве волго-уральской группировки определено больше самцов (16), чем самок (12); в забайкальской выборке было поровну птенцов обоих полов (8 : 8), во всех остальных гнездовых группировках в потомстве преобладали самки

(табл. 2). Однако все отклонения не были статистически достоверными ни в одной из выборок (табл. 3). Соответственно это относится и ко всей популяции, где из 155 птенцов определено 69 самцов и 86 самок (соотношение полов составило 0.445, $P = 0.181$). В полных выводках соотношение полов в разных гнездовых группировках и в целом в популяции сохраняло те же тенденции, что и во всем потомстве. Из 112 птенцов в полных выводках определено 48 самцов и 64 самки, соотношение полов варьировало в разных гнездовых группировках от 0.167 (зауральская) до 0.5 (забайкальская) и для всей популяции составило 0.429, $P = 0.174$, но также без статистической поддержки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку материал был получен из разных гнездовых группировок красавки в течение трех лет (2017–2019 гг.), мы не сравнивали непосредственно половой состав потомства этих гнездовых группировок между собой. Нашей задачей было оценить соотношение полов в потомстве красавки в природе, особенно в полных выводках, не испытавших действия отбора, на впервые собранном уникальном материале в разных частях ареала этого вида. Полученные данные о равном соотношении самцов и самок в полных выводках и в целом в потомстве красавок в разных гнездовых группировках указывают на то, что для этих моногамных видов птиц с большой продолжительностью жизни и заботой о потомках обоими родителями воспроизводство разнополых выводков является наиболее адаптивной репродуктивной стратегией. Однако не исключено, что

Таблица 2. Половой состав выводков красавки (*Anthropoides virgo*) в разных гнездовых группировках

Пол	Количество выводков с				Общее количество птенцов
	одним птенцом	двумя самцами	двумя самками	самцом и самкой	
азово-черноморская					
Самец	2	4	—	4	10
Самка	4	—	6	4	14
Всего					24
прикаспийская					
Самец	12	6	—	9	27
Самка	9	—	16	9	34
Всего					61
волго-уральская					
Самец	2	4	—	10	16
Самка	2	—	—	10	12
Всего					28
зауральская					
Самец	1	—	—	1	2
Самка	4	—	4	1	9
Всего					11
алтайская					
Самец	1	—	—	2	3
Самка	1	—	2	2	5
Всего					8
хакасская					
Самец	1			2	3
Самка			2	2	4
Всего					7
забайкальская					
Самец	2	2		4	8
Самка	2		2	4	8
Всего					16

Таблица 3. Соотношение полов среди всех птенцов и в полных выводках в потомстве красавки (*Anthropoides virgo*) в разных гнездовых группировках и в целом в популяции

Гнездовая группировка	Общее количество птенцов	Соотношение полов среди всех птенцов	<i>P</i>	Количество птенцов в полных выводках	Соотношение полов в полных выводках	<i>P</i>
азово-черноморская	24	0.417	0.386	18	0.444	0.500
прикаспийская	61	0.443	0.358	40	0.375	0.184
волго-уральская	28	0.571	0.395	24	0.583	0.386
зауральская	11	0.182	0.181	6	0.167	0.273
алтайская	8	0.375	0.500	6	0.333	0.500
хакасская	7	0.429	0.704	6	0.333	0.500
забайкальская	16	0.500	0.638	12	0.500	0.658
вся популяция	155	0.445	0.181	112	0.429	0.174

Примечание. *P* – вероятность значения точного теста Фишера.

тенденция к преобладанию самок, хоть и статистически незначимая, но регулярно наблюдаемая в большинстве гнездовых группировок и в целом в популяции, может являться косвенным ответом на ухудшение условий окружающей среды. Это согласуется с гипотезой Трайверса–Вилларда [31], по которой в неблагоприятных условиях родители минимизируют свои усилия на выращивание потомства путем воспроизводства энергетически менее затратного пола, каковым в большинстве случаев являются самки – более адаптированные и нуждающиеся в меньшем количестве корма, чем самцы. В благоприятные годы популяция стремится восполнить более ресурсозатратный и уязвимый пол, соответственно для большинства видов, в том числе журавлей, это самцы. У красавки условия для гнездования во всей европейской части ареала и в России в целом неуклонно ухудшаются из-за аридизации, олуговения и распахивания степей, возрастания рекреационной нагрузки, пожаров и других природных и антропогенных факторов, что приводит к общему снижению численности и воспроизводства вида [19]. Вместе с тем ресурсозатратность на выращивание потомства может быть обусловлена не только внешними условиями, но и возможностями самих родителей. Есть примеры того, что у долгоживущих моногамных видов птиц молодые неопытные родители, так же как и старовозрастные, производят больше самок, менее требовательных к качеству питания и заботе, чем самцы, тогда как в потомстве опытных родителей среднего репродуктивного возраста преобладает более энергетически затратный пол – самцы [32].

Процессы регулирования пола потомства, осуществляемые родителями в природе (в случае птиц – именно самками, являющимися гетерогаметным полом), вероятно, происходят и при разведении птиц в искусственно созданных условиях. За многолетний период наблюдений в потомстве японских журавлей (*Grus japonensis*) в питомнике редких видов журавлей Окского заповедника отмечено преобладание самок [33, 34], а в потомстве стерха (*Leucogeranus leucogeranus*) – равное соотношение обоих полов [34, 35]. Потомство искусственной популяции красавки не столь репрезентативно для обобщений, однако по нашим данным среди 22 птенцов и эмбрионов, которые были получены от одной самки красавки за 18 лет размножения в питомнике, определено 7 самок и 15 самцов. Красавки более толерантны к человеку по сравнению с другими видами журавлей и, возможно, для этой самки условия для воспроизводства и выращивания самцов были достаточно комфортными. Таким образом, проблема соотношения полов потомства журавлей в зависимости от разных факторов нуждается в дальнейшем изучении на репрезентативном биологическом материале, однако к настоящему времени мы можем

резюмировать, что у красавки в природе адаптивным является воспроизводство равного количества самцов и самок.

Авторы благодарят Ю.Н. Арылова, И.П. Арюлину, С.Б. Бальжимаеву, Р.В. Бахтина, В.П. Белика, А.Я. Бондарева, А.Г. Гринько, Е.В. Гугуеву, Г.С. Джамирзоева, В.Ю. Ильяшенко, В.Г. Калмыкова, Г.А. Калмыкову, М.В. Корепова, К.М. Куниева, В.М. Михайловского, Г.Н. Москова, И.В. Санникову, Т.В. Селезневу, А.И. Урусову, В.В. Шуркину, А.Л. Эбеля, а также сотрудников государственных природных заповедников “Дагестанский”, “Даурский”, “Черные земли” и “Хакаский” за помощь и содействие в проведении полевых работ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-04-01287, а также в рамках Государственного задания 0112-2019-0001.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fisher R.A. The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendon. Oxford, 1930.
2. Komdeur J., Pen I. Adaptive sex allocation in birds: The complexities of linking theory and practice // Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci. 2002. V. 357. № 1419. P. 373–380. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0927>
3. Mayr E. The sex ratio in wild birds // Am. Nat. 1939. V. 73. № 745. P. 156–179. <https://www.jstor.org/stable/2457422>
4. Alonso-Alvarez C. Manipulation of primary sex-ratio: an updated review // Avian Poult. Biol. Rev. 2006. V. 1. № 1. P. 1–20. <https://doi.org/10.3184/147020606783437930>
5. Goerlich-Jansson V.C., Muller M.S., Groothuis T.G.G. Manipulation of primary sex ratio in birds: Lessons from the Homing Pigeon (*Columba livia domestica*) // Integr. Comp. Biol. 2013. V. 53. № 6. P. 902–912. <https://doi.org/10.1093/icb/ict056>
6. Pike T.W., Petrie M. Maternal body condition and plasma hormones affect offspring sex ratio in peafowl // Anim. Behav. 2005. V. 70. P. 745–751. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.12.020>
7. Pike T.W., Petrie M. Offspring sex ratio is related to paternal train elaboration and yolk corticosterone in peafowl // Biol. Lett. 2005. V. 1. № 2. P. 204–207. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0295>
8. Pryke S.R., Griffith S.C. Genetic incompatibility drives sex allocation and maternal investment in a polymorphic finch // Science. 2009. V. 323. № 5921. P. 1605–1607. <https://doi.org/10.1126/science.1168928>

9. Clutton-Brock T. Sex ratio variation in birds // *Ibis*. 1986. V. 128. № 3. P. 317–329. <https://doi.org/10.1086/280824>
10. Donald P.F. Adult sex ratios in wild bird populations // *Ibis*. 2007. V. 149. № 4. P. 671–692. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2007.00724.x>
11. Székely T., Liker A., Freckleton R.P. et al. Sex-biased survival predicts adult sex ratio variation in wild birds // *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2014. V. 281. 20140342. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0342>
12. Liker A., Székely T. Mortality costs of sexual selection and parental care in natural populations of birds // *Evolution*. 2005. V. 59. № 4. P. 890–897. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01762.x>
13. Pipoly I., Bókonyi V., Kirkpatrick M. et al. The genetic sex-determination system predicts adult sex ratios in tetrapods // *Nature*. 2015. V. 527. № 7576. P. 91–94. <https://doi.org/10.1038/nature15380>
14. Паевский В. Половая структура и поло-специфическая выживаемость в популяциях птиц (обзор) // *Журн. общ. биологии*. 2020. Т. 81. № 4. С. 272–284. <https://doi.org/10.31857/S0044459620040077>
15. Hasselquist D., Kempenaers B. Parental care and adaptive brood sex ratio manipulation in birds // *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2002. V. 357. № 1419. P. 363–372. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0924>
16. Szász E., Kiss D., Rosivall B. Sex ratio adjustment in birds // *Ornis Hungarica*. 2012. V. 20. № 1. P. 26–36.
17. Нестеренко О.Н. Возможность манипулирования соотношением полов потомства птиц // *Науч. исследование в зоологических парках*. 2019. № 34. С. 82–93.
18. Crane Conservation Strategy / Eds Mirande C.M., Harris J.T. Baraboo, Wisconsin, USA: Intern. Crane Foundation, 2019. 454 p.
19. Ильяшенко Е.И. Журавль-красавка // *Красная книга Российской Федерации. Животные*. 2-е изд. М.: ФГБУ ВНИИ “Экология”, 2021. С. 689–691.
20. Белик В.П., Гугуева Е.В., Ветров В.В., Милобог Ю.В. Красавка в Северо-Западном Прикаспии: распространение, численность, успешность размножения // *Журавли Евразии (биология, распространение, миграции, управление)*. 2011. Вып. 4. С. 157–174.
21. Ильяшенко Е.И., Мудрик Е.А., Андриющенко Ю.А. и др. Миграции красавки (*Anthropoides virgo*, Gruiformes): дистанционное слежение на путях пролета и зимовках // *Зоол. журн*. 2021. Т. 100. № 9. С. 1028–1054. <https://doi.org/10.31857/S0044513421070059>
22. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. 3-е изд. М.: Академкнига, 2003. 431 с.
23. Longmire J.L., Lewis A.K., Brown N.C. et al. Isolation and molecular characterization of a highly polymorphic centromeric tandemrepeat in the family Falconidae // *Genomics*. 1988. V 2. P. 14–24.
24. Ogawa A., Solovei I., Hutchison N. et al. Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing *Cathartidae* birds // *Chromosome Res.* 1997. V. 5. P. 93–101. <https://doi.org/10.1023/A:1018461906913>
25. Bao W.B., Wu S.L., Zhang H.X. Sex identification of seven species of cranes in China by PCR // *J. Anim. Vet. Adv.* 2009. V. 8. № 6. P. 1137–1140.
26. Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Гамбург Е.А., Политов Д.В. Определение пола у десяти видов журавлей с помощью ДНК-маркера EE0.6 // *Генетика*. 2013. Т. 49. № 12. С. 1436–1439. <https://doi.org/10.7868/S0016675813120060>
27. Мудрик Е.А., Ильяшенко Е.И., Джамирзоев Г.С. и др. Соотношение полов у птенцов красавок (*Anthropoides virgo* Linnaeus, 1758) прикаспийской гнездовой группировки // *Генетика*. 2018. Т. 54. Приложение. С. S54–S57. <https://doi.org/10.1134/S0016675818130143>
28. Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Гамбург Е.А. и др. Неинвазивный метод идентификации пола птенцов журавлей по ДНК из капиллярных сосудов аллантаоиса // *Онтогенез*. 2013. Т. 44. № 5. С. 372–376. <https://doi.org/10.7868/S0475145013050054>
29. Wilson K., Hardy I.C. Statistical analysis of sex ratios: an introduction // *Sex Ratios: Concepts and Research Methods*. Cambridge Univ. Press, 2002. P. 48–92. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542053.004>
30. Abramson J.H. WINPEPI updated: Computer programs for epidemiologists, and their teaching potential DOI [org/10.1186/1742-5573-8-1](http://doi.org/10.1186/1742-5573-8-1) // *Epidemiol. Perspect. Innov.* 2011. V. 8. № 1. P. 1–9. <http://www.epi-perspectives.com/content/8/1/1>
31. Trivers R.L., Willard D.E. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring // *Science*. 1973. V. 179. № 4068. P. 90–92. <https://doi.org/10.1126/science.179.4068.90>
32. Weimerskirch H., Lallemand J., Martin J. Population sex ratio variation in a monogamous long-lived bird, the wandering albatross // *J. Anim. Ecol.* 2005. V. 74. № 2. P. 285–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2004.00922.x>
33. Нестеренко О.Н., Кашенцева Т.А. Преобладание самок в потомстве японских журавлей и его возможный адаптивный характер // *Тр. Окского заповедника*. Вып. 34. Рязань, 2015. С. 250–254.
34. Нестеренко О.Н., Кашенцева Т.А. Соотношение полов в потомстве японских журавлей и стерхов в питомнике Окского заповедника, Россия // *Журавли Евразии (распространение, биология)*. Вып. 6. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2021. С. 523–533.
35. Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Постельных К.А. и др. Соотношение полов в потомстве искусственной популяции стерха (*Grus leucogeranus* Pallas) // *Генетика*. 2015. V. 51. № 12. P. 1439–1443. <https://doi.org/10.7868/S0016675815120085>

Offspring Sex Ratio in the Monogamous Bird Species – Demoiselle Crane *Anthropoides virgo*

E. A. Mudrik^{a, *}, E. I. Pyashenko^b, K. A. Postelnykh^c, O. A. Goroshko^{d, e}, and D. V. Politov^a

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bSevertsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^cOka Crane Breeding Center, Oka State Nature Biosphere Reserve, Brykin Bor, Russia

^dDaursky State Nature Biosphere Reserve, Nizhny Tsasuchey, Russia

^eInstitute of Nature Resources, Ecology and Cryology, Russian Academy of Sciences, Chita, Russia

*e-mail: mudrik@vigg.ru

Using the molecular genetic sex marker EE0.6 the gender of 155 chicks of the monogamous species of birds – Demoiselle Crane (*Anthropoides virgo* Linnaeus, 1758) from the Azov-Black Sea, Caspian, Volga-Ural, Trans-Ural, Altai, Khakass and Transbaikal breeding groups was determined. It has been shown that complete broods with two chicks represented by a male and a female were more frequent than broods with two chicks of the same sex. Two-female chick broods prevailed over two-male chick broods, although the differences were not statistically significant. Totally, out of 155 chicks, 69 males and 86 females were identified. Out of 112 chicks in complete broods, 48 individuals were males, and 64 were females. Despite the tendency for females predominance in the total population and in most breeding groups, the ratio of males and females in the Demoiselle Crane in general (0.445, $P = 0.181$) and in complete broods (0.429, $P = 0.174$) was parity, which reflects the adaptive and reproductive strategy of this monogamous long-lived bird.

Keywords: crane, molecular genetic sexing, male, female, chick, brood, breeding group, EE0.6.

**ВНУТРИВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ АЗИАТСКОЙ
ГОРБУШИ ПО ДАННЫМ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА *cytb***

© 2022 г. Д. А. Зеленина^{1, *}, Л. А. Животовский^{1, 2}, В. А. Сошнина^{1, 3},
О. Ю. Вилкова¹, М. К. Глубоковский¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва, 107187 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: d.zelenina@gmail.com

Поступила в редакцию 24.01.2022 г.

После доработки 30.05.2022 г.

Принята к публикации 07.06.2022 г.

Работа посвящена изучению внутривидового генетического полиморфизма горбуши. Уникальность этого представителя тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* заключается в существовании двух аллохронных репродуктивно изолированных группировок — линий четных и нечетных лет нереста. Нами впервые исследована изменчивость митохондриального гена цитохрома *b* (*cytb*) во всех основных регионах Дальнего Востока России. Показана уверенная генетическая дифференциация между линиями, в то время как внутри линий стабильных межрегиональных и темпоральных различий выявлено не было. Гаплотипическое разнообразие в пределах четной линии заметно превышало таковое в пределах нечетной, а генетические различия между “четной” и “нечетной” горбушей превышали межпопуляционную изменчивость в пределах каждой из линий.

Ключевые слова: горбуша, митохондриальная ДНК, ген *cytb*, генетический полиморфизм, внутривидовая структура.

DOI: 10.31857/S0016675822110145

Горбуша (*Oncorhynchus gorbusha*) обитает в бассейне северной части Тихого океана и в промысловых количествах в сопредельных водах Ледовитого океана. Нерестовый ареал этого анадромного вида тихоокеанских лососей простирается от рек Корейского полуострова до р. Лены в Азии и от рек Калифорнии до р. Маккензи в Северной Америке. Нагульные скопления горбуши в океане концентрируются в прикурильском и приалеутском районах, а также в Японском море; численность азиатских популяций горбуши заметно выше, чем американских. Динамика численности этого вида характеризуется резкими короткопериодными колебаниями по четным и нечетным годам, что связано с созреванием подавляющего большинства особей на втором году жизни [1, 2]; в связи с этим горбуша на всем ареале представлена двумя репродуктивно независимыми линиями — четных и нечетных лет нереста. Имеются также значительные по амплитуде долгопериодные — до нескольких десятков лет — изменения численности горбуши, которые, как полагают, определяются колебаниями абиотических факторов среды, влияющих на воспроизводство популяций данного

вида, а также, возможно, и глобальным потеплением [3].

Горбуша — доминирующий объект лососевого промысла на Дальнем Востоке России. Ежегодный вылов ее достигает более 80% от всех добываемых у нас тихоокеанских лососей и в отдельные годы превышает 400 тыс. тонн. Кроме того, в настоящее время горбуша наряду с кетой — основной объект искусственного воспроизводства дальневосточных лососей. Несмотря на определенные успехи в изучении динамики численности и популяционной структуры горбуши, прогнозирование мощности ее подходов к береговым районам промысла как в Азии, так и в Северной Америке зачастую бывает неудачным: амплитуда колебаний численности взрослых особей в каждой конкретной локальности оказывается труднопредсказуемой. Это обуславливает большие потери уловов в одних районах промысла и переловы горбуши в других.

В течение ряда десятилетий внутривидовая структура горбуши изучалась по экологическим [4, 5], морфологическим [6, 7] и кариологическим признакам [8], а также селективно значимым белковым маркерам [6, 9–15]. С наступлением XXI в.

популяционные исследования горбуши преимущественно основывались на различных типах молекулярно-генетических маркеров: митохондриальных [16–19], ядерных селективно-нейтральных микросателлитных локусах [20, 21], адаптивном локусе главного комплекса гистосовместимости МНС-1 [22] и совокупности однонуклеотидных полиморфизмов [23].

Взгляды исследователей на популяционную структуру горбуши достаточно сильно разнятся в деталях, при этом большинство из них сходятся во мнении относительно главных принципов внутривидовой организации данного вида, выделяя несколько иерархических группировок. Иными словами, горбуша, по их мнению, в пределах каждой из линий представлена рядом относительно независимых самовоспроизводящихся локальных группировок. Эти группировки отвечают популярной в ихтиологии концепции локального стада [11, 24–26], которая в настоящее время лежит в основе стратегии популяционных исследований всех тихоокеанских лососей и практических рекомендаций по их рациональному использованию.

Основная цель настоящего исследования заключается в сравнительном изучении митохондриального полиморфизма двух линий горбуши и оценке уровня дифференциации локальных и сезонных группировок внутри них. В связи с этим при подборе материала для работы мы руководствовались следующими принципами: 1) анализ одинакового числа выборок из каждой линии, а именно: 15 выборок четных лет нереста и 15 – нечетных; 2) представленность всех основных регионов воспроизводства горбуши Дальнего Востока России для обеих линий; 3) для каждого региона – изучение равного числа выборок, в ряде случаев позволившее провести сравнение сборов разных лет для конкретных локальных стад и разных сроков их нерестового хода, т.е. разных сезонных рас (табл. 1), и на этой основе оценить стабильность дифференциации групп в поколениях.

Работа посвящена изучению полиморфизма митохондриального гена *cytb* в популяциях азиатской горбуши и представляет собой первое исследование, охватывающее все основные регионы воспроизводства этого вида на Дальнем Востоке России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для молекулярно-генетического анализа азиатских стад был собран сотрудниками ФГБНУ “ВНИРО” в период с 2006 по 2019 гг. (табл. 1). Все изученные особи горбуши были выловлены в реках или в их приустьевом пространстве в преднерестовом состоянии.

Выделение и очистку тотальной ДНК из тканей плавников или сердца исследуемых особей

горбуши проводили методом адсорбции на микролонках AcroPrep™ 96 filter plate, 1 mL – 1.0 µm, glass fiber media (PALL, США), основываясь на методике, описанной ранее [27].

Аmplификацию гена *cytb* и постановку си-квенс-реакции осуществляли в соответствии с опубликованной методикой [28]. Секвенирование проводили на приборе ABI Prism Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США).

Для обработки результатов секвенирования и множественного выравнивания последовательностей использовали пакет программ Geneous 6.0.5 [29]. Филогенетические отношения между гаплотипами визуализировали в программе PopArt [30] с применением алгоритма TCS [31]. Генетическое разнообразие, молекулярную дисперсию и уровень дифференциации выборок на основании вероятностного теста [32] оценивали в программе Arlequin v3.5.1.3 [33].

Для графического представления и выделения генетически близких групп выборок вычисляли попарное генетическое сходство (r) между выборками [34] по данным о частотах 12 гаплотипов (A1–A6, B1–B6), а затем собственные векторы (“главные координаты”) корреляционной матрицы значений r [35] с дальнейшим вращением методом Varimax с использованием компьютерного пакета SPSS [36].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследуемый фрагмент длиной 1018 пн соответствовал позициям 15577–16594 полного митохондриального генома горбуши (GenBank #EF455489) и позициям 74–1094 гена *cytb*. Суммарно в совокупности образцов выявлено 73 гаплотипа. В пределах линии горбуши четных лет нереста обнаружено 53 гаплотипа, а в нечетных – 33; при этом только 13 присутствовали в обеих линиях. Полученные последовательности депонированы в Генбанк под номерами, указанными в Приложении. Для облегчения восприятия материала названия гаплотипов в Приложении и на рисунках приведены в сокращенном варианте: A1 вместо OG-A1, B1 вместо OG-B1 и т.д. Гаплотипический состав выборок представлен в Приложении.

Анализ гаплотипической сети, построенной с применением алгоритма кластеризации TCS (рис. 1), позволяет разделить все 73 последовательности на две основные группы A и B с центральными гаплотипами OG-A1 и OG-B1 соответственно. Помимо этого внутри каждой из этих совокупностей было выявлено некоторое количество массовых гаплотипов, являющихся центральными для своих гаплогрупп A2, A3, A4, A5, A6, B2, B3, B4, B5, B6. Как следует из рис. 1 и Приложения, только 7 из 12 центральных гап-

Таблица 1. Характеристика исследованного материала

Регион	Место сбора	Выборки четных лет нереста			Выборки нечетных лет нереста		
		обозначение	даты сбора	объем выборки	обозначение	даты сбора	объем выборки
Чукотка	Мейнпильгынская озерно-речная система	CHUK14	02–15.07.2014	30	CHUK13	21.06–18.07.2013	30
		APU06	02–04.08.2006	31	APU07	02.07.2007	30
		APU16E	23.06–09.07.2016	32	APU15E	22.06–05.07.2015	32
		APU16L	31.07.2016	32	APU15L	02–08.08.2015	32
Магадан	р. Тауй	TAUI12	16.07.2012	27	TAUI11	15.07.2011	45
		TAUI16	19.07.2016	29	TAUI17	27.07.2017	32
Западная Камчатка	р. Большая	BOL06	09.08.2006	27	BOL09	06.08.2009	32
		BOL10	24.07.2010	30	BOL11	27–28.07.2011	31
		BOL12	02.08.2012	31	BOL13	2013 г.	32
Хабаровский край	р. Амур	AMUR10	15.07.2010	29	AMUR09	2009 г.	32
	р. Ботчи	BOT18	12–17.07.2018	31	BOT19	10–16.07.2019	32
Сахалин	р. Поронай	POR10	30.07.2010	31	POR09	31.07.2009	28
		KUR14	15.09.2014	33	KUR13E	09.08.2013	44
Южные Курилы	р. Курилка (KUR)/ Курильский залив (KURZ)	KURZ16	15.08.2016	31	KUR13L	27.09.2013	48
		KURZ18	19.08.2018	31	KUR15	27.08.2015	32

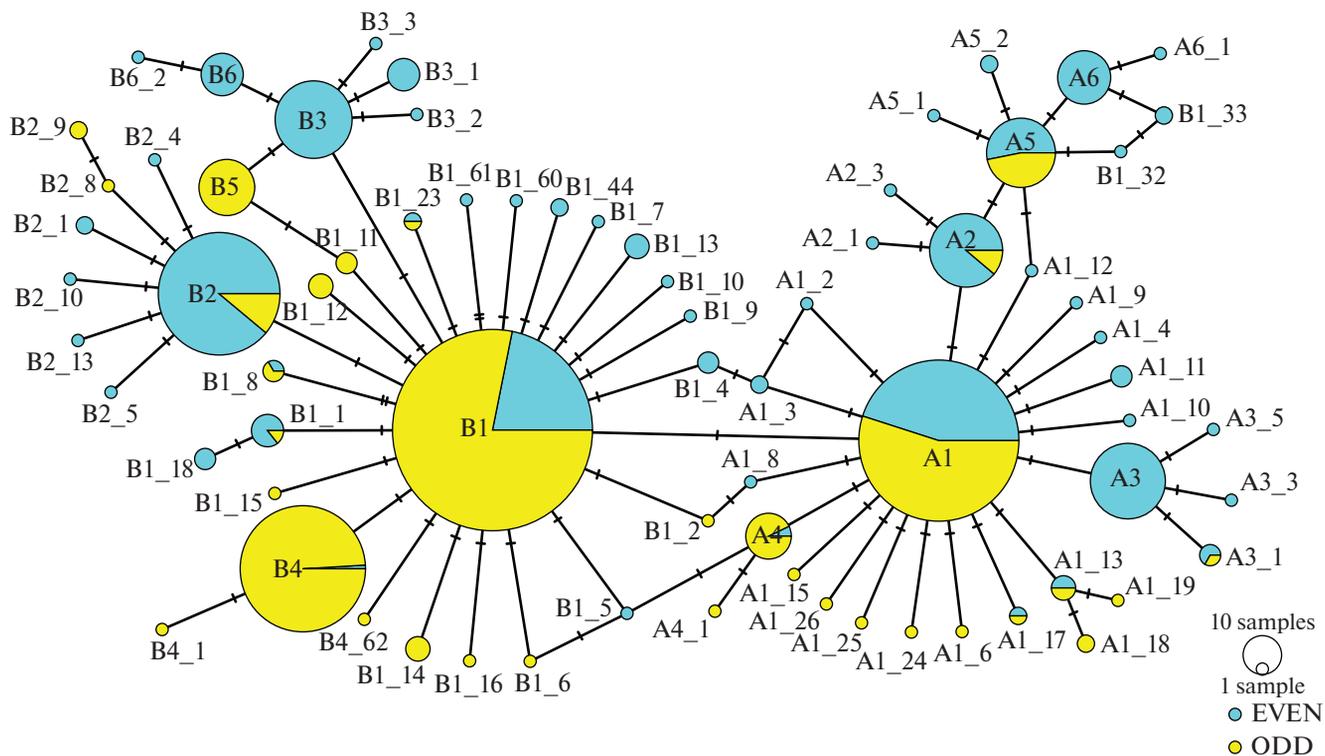


Рис. 1. Сеть гаплотипов *cytb* горбуши, построенная с применением алгоритма кластеризации TCS. Для каждого гаплотипа показана доля особей четных и нечетных лет нереста.

типов присутствуют в обеих линиях горбуши, причем лишь два из них, OG-A1 и OG-B1, встречаются массово практически во всех выборках как в четные, так и в нечетные годы. Гаплотипы OG-A2, OG-A5 и OG-B2 существенно преобладают в линии четных лет нереста, но при этом были отмечены по крайней мере у нескольких рыб другой линии. Гаплотипы OG-A4 и OG-B4, за единичными исключениями, характерны только для нечетной линии горбуши. Оставшиеся пять центральных гаплотипов присущи лишь одной из линий: OG-A3, OG-A6, OG-B3 и OG-B2 – линии четных лет нереста, а OG-B5 – линии нечетных.

Анализ вариабельности гена *cytb* и сравнительная оценка основных параметров генетической изменчивости в двух линиях горбуши указывают на заметно более высокий митохондриальный полиморфизм горбуши четных лет нереста (табл. 2). Это наглядно подтверждается при сопоставлении TCS-сетей гаплотипов (рис. 2), построенных для каждой из линий в отдельности. Сеть гаплотипов “четной” горбуши значительно разветвленное, в ней можно выделить большее количество гаплогрупп и массовых гаплотипов, распространяемых по всему ареалу или на значительной его части. В случае нечетной линии горбуши, напротив, широкое распространение на ареале характерно только для трех гаплогрупп A1, B1 и B4, централь-

ные гаплотипы которых присутствуют во всех регионах воспроизводства.

Анализ молекулярной дисперсии, результаты которого представлены в табл. 3, был выполнен как для всей совокупности особей, так и для каждой из линий в отдельности. Как и следовало ожидать, при всех вариантах анализа наибольшая доля генетического разнообразия приходится на его внутривидовую компоненту. В случае исследования горбуши обеих линий она составила 87.52%, при этом различия между “четной” и “нечетной” горбушей (9.33%) превышали межпопуляционную изменчивость в пределах каждой из линий (3.16%). При проведении расчетов для каждой из линий по отдельности выраженная межпопуляционная изменчивость (6.07%) была обнаружена только у горбуши нечетных лет нереста.

Четкую дифференциацию между линиями четных и нечетных лет азиатской горбуши также демонстрируют главные координаты, построенные по данным о частотах гаплотипов мтДНК (рис. 3). Отличие прослеживается по всем трем главным координатам, на которые приходится 96.7% всей изменчивости. Оценка уровня межвыборочных различий с помощью вероятностного теста (табл. 4) в пределах каждой из линий указывает на статистически значимую дифференциацию

Таблица 2. Полиморфизм последовательности гена *cytb* в выборках горбуши. Обозначения выборок приведены в соответствии с табл. 1

Линия горбуши четных лет нереста							Линия горбуши нечетных лет нереста						
Выборка	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	$\pi \times 100$	<i>h</i>	<i>Pi</i>	Выборка	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	$\pi \times 100$	<i>h</i>	<i>Pi</i>
CHUK14	30	11	10	0.1994	0.9034	2.029885	CHUK13	30	8	8	0.1425	0.777	1.450575
APU06	31	13	12	0.2459	0.9204	2.503226	APU07	30	9	10	0.1685	0.823	1.714943
APU16E	32	10	8	0.1836	0.8367	1.868952	APU15E	32	7	8	0.1143	0.744	1.163306
APU16L	32	12	11	0.2056	0.8387	2.092742	APU15L	32	7	9	0.1763	0.8165	1.794355
TAUI12	27	12	10	0.2228	0.9088	2.267806	TAUI11	45	10	12	0.184	0.8182	1.872727
TAUI16	29	8	7	0.1669	0.8498	1.699507	TAUI17	32	7	8	0.1767	0.8226	1.798387
BOL06	27	17	15	0.2569	0.9487	2.615385	BOL09	32	6	8	0.1048	0.6714	1.066532
BOL10	30	14	13	0.2658	0.9057	2.705747	BOL11	31	7	7	0.1052	0.714	1.070968
BOL12	31	16	12	0.226	0.9118	2.301075	BOL13	32	12	14	0.1751	0.8448	1.782258
AMUR10	29	12	13	0.2057	0.9163	2.093596	AMUR09	32	7	6	0.0913	0.6653	0.929435
POR10	31	12	11	0.2036	0.8882	2.073118	POR09	28	6	6	0.1091	0.746	1.111111
VOT18	31	9	8	0.1496	0.8344	1.522581	VOT19	32	9	8	0.124	0.8004	1.262097
KUR14	33	7	6	0.1793	0.8352	1.825758	KUR13E	44	6	5	0.0657	0.537	0.669133
KURZ16	31	13	13	0.2159	0.9161	2.197849	KUR13L	48	8	8	0.0576	0.4583	0.585993
KURZ18	31	11	11	0.2146	0.8774	2.184946	KUR15	32	4	3	0.0614	0.5544	0.625
Среднее		11.8	10.67	0.2094	0.8861	2.132145	Среднее		7.53	8	0.1238	0.7195	1.259788

Примечание. *N* – объем выборки; *H* – число гаплотипов; *S* – число вариабельных сайтов; π – нуклеотидное разнообразие; *h* – гаплотипическое разнообразие; *Pi* – среднее число попарных различий между гаплотипами.

Таблица 3. Результаты оценки молекулярной дисперсии AMOVA

ОБЕ ЛИНИИ					
Уровень различий	<i>df.</i>	Сумма квадратов	Дисперсия	% дисперсии	Индекс фиксации
Между группами	1	21.175	0.04216	9.33	F_{ST} : 0.09326
Между популяциями внутри групп	28	23.945	0.01427	3.16	F_{SC} : 0.03482
Внутри популяций	937	370.711	0.39564	87.52	F_{ST} : 0.12484
Всего	966	415.831	0.45207		
ЧЕТНАЯ ЛИНИЯ					
Уровень различий	<i>df.</i>	Сумма квадратов	Дисперсия	% дисперсии	Индекс фиксации
Между популяциями	14	16.454	0.00371	0.35	F_{ST} : 0.00348
Внутри популяций	440	467.612	1.06275	99.65	
Всего	454	484.066	1.06647		
НЕЧЕТНАЯ ЛИНИЯ					
Уровень различий	<i>df.</i>	Сумма квадратов	Дисперсия	% дисперсии	Индекс фиксации
Между популяциями	14	15.873	0.02289	6.07	F_{ST} : 0.06069
Внутри популяций	497	176.047	0.35422	93.93	
Всего	511	191.920	0.37711		

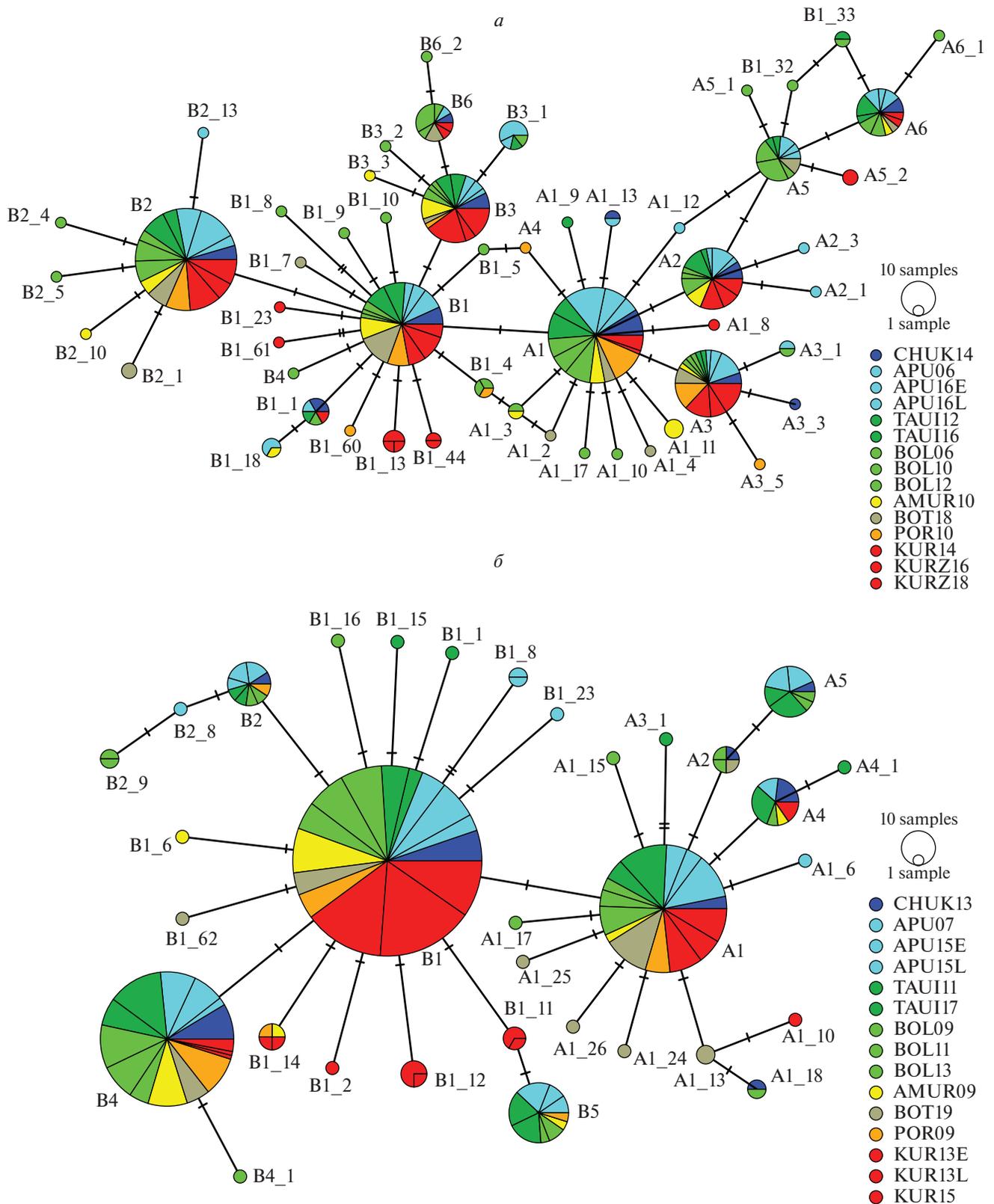


Рис. 2. Гаплотипическая сеть *cytb* горбуши четных (а) и нечетных (б) лет нереста, построенная с применением алгоритма кластеризации TCS. Для каждого гаплотипа отмечены доли особей из различных выборок, обозначенных в соответствии с табл. 1. Выборы из рек разных регионов Дальнего Востока России представлены различными цветами: Чукотка – темно-синий, Восточная Камчатка – светло-бирюзовый, Магаданское побережье – темно-зеленый, Западная Камчатка – светло-зеленый, р. Амур – светло-желтый, Северное Приморье (р. Ботчи) – серый, Сахалин – оранжевый, Южные Курилы – красный. Размер круга соответствует количеству особей, несущих данный гаплотип.

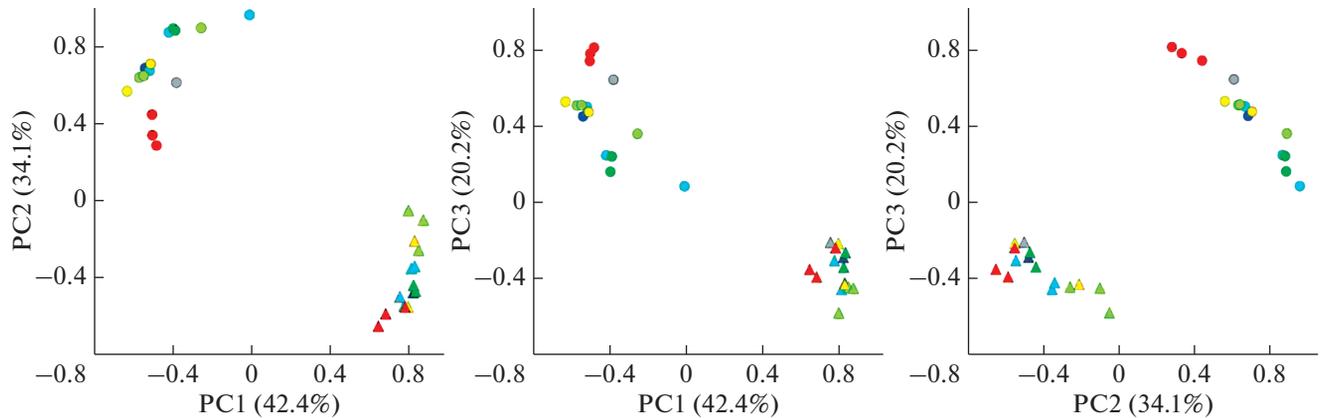


Рис. 3. Кластеризация выборок горбуши линий нечетных (круги) и четных (треугольники) лет нереста. Вклад трех главных координат в общую изменчивость представлен по осям. Цвета, обозначающие региональную принадлежность выборок, приведены в легенде к рис. 2.

южнокурильских популяций горбуши нечетных лет нереста от прочих выборок этого поколения, что и обуславливает межпопуляционную изменчивость “нечетной горбуши”, выявленную тестом AMOVA.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение полиморфизма митохондриальной ДНК традиционно находит широкое применение в филогенетических и филогеографических построениях. Настоящая работа является частью масштабных исследований изменчивости митохондриального гена *cytb* тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* в пределах всего ареала. Сравнительный анализ уровня варибельности показал, что среди пяти анадромных видов (чавыча, кижуч, нерка, кета, горбуша) этого рода для горбуши характерен наиболее высокий внутривидовой полиморфизм [37, 38]. Большинство гаплотипов *cytb* отличаются на одну нуклеотидную замену, что наглядно продемонстрировано на рис. 1; это утверждение касается как массовых гаплотипов, так и происходящих от них минорных.

Линия четных лет нереста более полиморфна по гену *cytb*, ее гаплотипическая сеть значительно разветвленнее, и число массовых гаплотипов, отмеченных в большинстве регионов, существенно превышает таковое для “нечетной” линии. Этот результат находится в соответствии с данными Л.Т. Бачевской и В.В. Переверзевой [17], полученными ранее при изучении фрагмента этого гена в 2 раза меньшей длины. В то же время согласно результатам ПЦР-ПДРФ полного митохондриального генома горбуши [16] и анализа нуклеотидных последовательностей контрольного региона [20] более высокий уровень полиморфизма наблюдался в линии нечетных лет нереста, а в случае сравнительного исследования комбинированных гаплотипов двух генов мтДНК —

ND2 и *cytb* — этот показатель для обеих линий был одинаков [19]. Таким образом, варибельность мтДНК в целом выше в линии нечетных лет нереста, а обратный эффект, отмеченный для гена *cytb*, может быть обусловлен особенностями молекулярной эволюции этого белка и требует дополнительного рассмотрения. Что же касается исследований ядерного генома, аллозимные [15] и микросателлитные [21] маркеры обнаруживали более высокий полиморфизм в “четной” линии, а SNP-локусы [23] — в “нечетной”.

В отношении популяционной структуры вида у горбуши в научной литературе рассматривались различные популяционно-генетические модели, которые, на наш взгляд, можно разделить на три группы.

1. “Модель локальных стад”, согласно которой горбуша дифференцирована на ряд отграниченных друг от друга самовоспроизводящихся группировок, приуроченных к районам нереста и даже к отдельным нерестовым рекам или же к определенным районам морского нагула. К этой же модели можно отнести и взгляды тех исследователей, которые выделяют у горбуши сезонные расы в качестве крупных внутривидовых группировок.

2. “Модель перемешивающихся стад”, согласно которой стада горбуши регулярно обмениваются большим количеством мигрантов, т.е. по сути являются панмиксными [9, 39, 40]. Эта модель была популярна среди американских исследователей в 60–70-е гг. Наши данные по изменчивости митохондриальной ДНК у горбуши не подтверждают и эту гипотезу, поскольку кластеризация выборок горбуши внутри каждой из темпоральных линий все же не хаотична в пространстве и во времени.

3. “Модель флуктуирующих стад”, согласно которой границы и количество самовоспроизводящихся стад горбуши внутри темпоральных линий горбуши не являются константными, а под-

Таблица 4. Результаты вероятностного теста (exact test) на попарную дифференцированность выборок горбуши четных (А) и нечетных (Б) лет нереста – под диагональю; уровень статистической достоверности различий (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; NS – различия недостоверны) – над диагональю. Статистически достоверные различия отмечены полужирным курсивом

А															
	CHUK14	APU06	APU16E	APU16L	TAUI12	TAUI16	BOL06	BOL10	BOL12	AMUR10	VOT18	POR10	KUR14	KURZ16	KURZ18
CHUK14		NS	*	NS	NS										
APU06	0.301		NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	**	NS	*
APU16E	0.819	0.056		NS	NS	NS	NS								
APU16L	0.562	0.128	0.65		NS	***	NS	**							
TAUI12	0.971	0.619	0.559	0.762		NS	*	NS	NS						
TAUI16	0.892	0.104	0.967	0.731	0.822		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
BOL06	0.758	0.528	0.483	0.855	0.953	0.434		NS	NS	NS	NS	NS	***	NS	**
BOL10	0.068	0.013	0.264	0.298	0.108	0.080	0.771		NS	**	*	NS	***	*	***
BOL12	0.873	0.079	0.936	0.942	0.750	0.873	0.952	0.452		NS	NS	NS	*	NS	*
AMUR10	0.663	0.158	0.318	0.131	0.740	0.705	0.275	0.009	0.458		*	NS	NS	NS	NS
VOT18	0.208	0.105	0.206	0.232	0.159	0.184	0.098	0.013	0.139	0.049		NS	**	NS	**
POR10	0.191	0.247	0.192	0.059	0.477	0.177	0.391	0.130	0.083	0.119	0.178		**	NS	*
KUR14	0.039	0.003	0.091	0.001	0.028	0.076	0.001	0.000	0.013	0.095	0.003	0.007		NS	NS
KURZ16	0.931	0.354	0.780	0.163	0.832	0.807	0.521	0.046	0.509	0.674	0.275	0.556	0.224	NS	NS
KURZ18	0.074	0.019	0.084	0.002	0.053	0.033	0.009	0.001	0.022	0.080	0.003	0.029	0.962	0.371	NS
Б															
	CHUK13	APU07	APU15E	APU15L	TAUI11	TAUI17	BOL09	BOL11	BOL13	AMUR09	VOT19	POR09	KUR13E	KUR13L	KUR15
CHUK13		*	NS	***	***	*									
APU07	0.013		**	NS	NS	NS	***	**	NS	***	NS	*	***	***	**
APU15E	0.409	0.01		NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	***	***	NS
APU15L	0.203	0.111	0.552		NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	***	***	**
TAUI11	0.068	0.149	0.014	0.275		NS	**	*	NS	***	*	NS	***	***	***
TAUI17	0.136	0.166	0.345	0.995	0.125		NS	NS	NS	NS	*	NS	***	***	**
BOL09	0.467	0.001	0.426	0.133	0.002	0.092		NS	NS	NS	*	NS	***	***	*
BOL11	0.935	0.007	1	0.331	0.036	0.226	0.932		NS	NS	*	NS	**	***	NS
BOL13	0.423	0.438	0.674	0.721	0.086	0.735	0.175	0.734		NS	NS	NS	**	***	NS
AMUR09	0.604	0	0.625	0.092	0.001	0.07	1	0.929	0.111		**	NS	***	***	*
BOT19	0.048	0.064	0.04	0.029	0.022	0.031	0.018	0.083	0.503	0.008		NS	***	***	*
POR09	0.428	0.021	0.726	0.519	0.25	0.294	0.361	0.892	0.794	0.414	0.288		***	***	*
KUR13E	0.001	0	0	0	0	0	0.001	0.003	0.002	0.001	0	0	NS	NS	NS
KUR13L	0	0	0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.557	NS	NS
KUR15	0.011	0.002	0.055	0.004	0	0.004	0.024	0.078	0.111	0.024	0.024	0.021	0.272	0.48	

вержены периодическим изменениям во времени [6]. Эти изменения, на наш взгляд, обусловлены регулярными, иногда значительными, флуктуациями миграционных потоков между локальными стадами горбуши. В соответствии с моделью флуктуирующих стад локальное стадо имеет определенную региональную приуроченность – в смысле районов происхождения составляющих его особей. Однако степень региональной приуроченности локального стада (т.е. процент особей с происхождением из рек этого региона) может значительно меняться из года в год: от полной приуроченности (около 100%) до частичной (80–60% и менее).

Модель флуктуирующих стад далека от гипотезы панмиксии в модели “перемешивающихся стад”: флуктуации миграционных потоков могут происходить асинхронно в разных районах ареала. Следствием этого будет сохранение существовавшей ранее популяционной структуры в одних районах ареала вида и перестройка в других. Иными словами, в одних участках ареала популяционная структура может временно соответствовать панмиксной модели со значительным обменом особей. Со временем ситуация с потоком генов может измениться на противоположную. В частности, массовый стрейнг у горбуши может происходить в период смены доминирующей по численности линии [41, 42]. Важнейшими параметрами модели флуктуирующих стад являются интенсивность миграций и периодичность изменения мощности миграционных потоков (соизмеримая с длительностью нескольких генераций). Таким образом, модель флуктуирующих стад в отношении жесткости субпопуляционных границ является как бы промежуточной между моделью локальных стад и моделью перемешивающихся стад. Однако практические следствия из модели флуктуирующих стад (относящиеся к теории прогнозирования численности, оценке запасов, стратегии рациональной эксплуатации, динамике популяционного состава) не будут “промежуточными” и поэтому требуют разработки соответствующей теории [43]. Модель флуктуирующих стад является по своему характеру динамической во времени, а не статической как модели локального стада или перемешивающегося стада.

Как уже отмечалось выше, среди сторонников концепции локальных стад горбуши не существовало единого мнения об их привязанности к элементам пространственно-временной структуры вида. Часть исследователей объединяли в рамках рыбохозяйственного локального стада горбушу, воспроизводящуюся в реках одного крупного региона. Важнейшими региональными стадами азиатской горбуши и по сей день считают: западнокамчатское, восточнокамчатское, амурское, восточносахалинское, южнокурильское [44–46]. Другие

ихтиологи полагали, что у азиатской горбуши наиболее крупными являются локальные группировки, связанные с конкретными районами морского нагула – япономорским, охотоморским, берингоморским [5, 47]. И, наконец, существовала точка зрения, что сезонные расы азиатской горбуши (летняя и осенняя) представляют собой самостоятельные крупные темпоральные группировки [48–51].

Полученные нами результаты однозначно указывают на то, что на всем ареале горбуша представлена в первую очередь двумя независимыми популяционно-генетическими группами – аллохронными линиями четных лет и нечетных лет нереста. Принципиально такой же результат был ранее получен при многомерном анализе морфологических экстерьерных признаков на всем ареале дальневосточной горбуши [6, 7]. Отметим также, что ранее были обнаружены рельефные и устойчивые во времени различия между линиями горбуши четных и нечетных лет нереста по селективно значимым белковым маркерам [9, 10, 12, 52], кариологическим особенностям [8] и молекулярно-генетическим маркерам [16, 18–21, 23].

Очевидно, что существование горбуши на протяжении всего ареала в виде двух темпорально и репродуктивно изолированных группировок – линий четных и нечетных лет нереста – обусловлено ее уникальной внутривидовой структурой. Строго двухлетний жизненный цикл обеспечивается присутствием в каждой из линий единственной возрастной группы (исключения из этого правила столь редки, что могут в данном случае в расчет не приниматься). Таксономический статус и генезис этих темпоральных группировок горбуши будут рассмотрены в последующих публикациях.

Локализация выборок горбуши в пространстве главных координат подтверждает существование устойчивых различий между линиями четных и нечетных лет нереста (рис. 3), при этом никаких обособленных кластеров выборок, приуроченных к определенным участкам ареала (континентам, рекам, более крупным регионам воспроизводства, районам морского нагула) или к сезонным расам, методом многомерного шкалирования выявлено не было. Таким образом, заметной иерархии популяционных группировок горбуши внутри линии четных или нечетных лет нереста по данным анализа митохондриальной ДНК мы не наблюдаем. В то же время в расположении выборок в пространстве главных компонент нет и хаотичности: в линии горбуши нечетных лет нереста прослеживается определенное сходство между южнокурильскими выборками, что было обнаружено и при проведении попарных сравнений выборок (табл. 4Б).

Таким образом, на основании полученных данных популяционная структура у горбуши представ-

ляется нам двухуровневой. Первый уровень составляют линии четных и нечетных лет нереста, каждая из которых является самовоспроизводящейся темпоральной группировкой. Второй уровень представлен системой субизолятов, взаимодействующих друг с другом внутри каждой темпоральной линии горбуши. Мы рассчитываем исследовать характер взаимодействий между группировками горбуши в пределах линий, уточнить их статус и определить степень внутривидовой дифференциации в ходе проводимых исследований полиморфизма ядерной ДНК.

Авторы благодарят Е.В. Голубь, А.В. Гриценко, А.А. Дуленина, А.Н. Ельникова, А.В. Семенихина, О.Н. Сараванского, Т.Ю. Углову и ряд других сотрудников Камчатского, Магаданского и Хабаровского филиалов ФГБНУ “ВНИРО”, принимавших участие в сборе генетического материала.

Работа выполнена при поддержке гранта Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1084).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Иванков В.Н.* О возрастной структуре популяции горбуши // *Вопр. ихтиологии.* 1965. Т. 5. № 4. С. 662–667.
2. *Bilton H.T., Ricker W.E.* Supplementary checks on the scales of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum salmon (*O. keta*) // *J. Fish. Res. Board of Canada.* 1965. V. 22. № 6. P. 1477–1489.
3. *Глубоковский М.К., Марченко С.Л.* К вопросу о становлении жизненных стратегий у тихоокеанских лососей *Oncorhynchus* (Salmonidae) // *Вопросы ихтиологии.* 2019. Т. 59. № 4. С. 429.
4. *Смирнов А.И.* Биология, размножение и развитие тихоокеанских лососей. М.: Изд-во МГУ, 1975. 335 с.
5. *Гриценко О.Ф.* О популяционной структуре горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) // *Вопр. ихтиологии.* 1981. Т. 21. № 5. С. 787–799.
6. *Глубоковский М.К., Животовский Л.А.* Популяционная структура горбуши: система флуктуирующих стад // *Биология моря.* 1986. Т. 12. № 2. С. 39–44.
7. *Глубоковский М.К.* Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука, 1995. 343 с.
8. *Горшкова Г.В., Горшков С.А.* Хромосомный полиморфизм горбуши четных и нечетных лет // *Докл. АН СССР.* 1983. Т. 273. № 4. С. 1023–1024.
9. *Aspinwall N.* Genetic analysis of North American population of the pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) possible evidence for the neutral mutation random drift hypothesis // *Evolution.* 1974. V. 28. № 2. P. 295–305.
10. *Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Малинина Т.В. и др.* Популяционно-генетические различия между смежными поколениями у горбуши, размножающейся в реках азиатского побережья Северной Пацифики // *Генетика и размножение морских животных.* Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1981. С. 95–104.
11. *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1983. 279 с.
12. *Beacham I.D., Withlei R.E., Gould A.P.* Biochemical genetic stock identification of pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) in southern British Columbia and Puget Sound // *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.* 1985. V. 42. P. 1474–1483.
13. *Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. и др.* Балансирующий отбор как возможный фактор поддержания единообразия аллельных частот ферментных локусов в популяциях тихоокеанского лосося – горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) // *Генетика.* 1987. Т. 23. № 10. С. 1884–1896.
14. *Кирпичников В.С.* Генетические исследования тихоокеанских лососей // *Журн. общей биологии.* 1990. Т. 51. № 1. С. 1–15.
15. *Hawkins S.L., Varnavskaya N.V., Matzak E.A. et al.* Population structure of odd-broodline Asian pink salmon and its contrast to the even-broodline structure // *J. Fish Biology.* 2002. V. 60. P. 370–388. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2001.1850>
16. *Churikov D., Gharrett A.J.* Comparative phylogeography of the two pink salmon broodlines: an analysis based on a mitochondrial DNA genealogy // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. № 6. P. 1077–1101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01506.x>
17. *Бачевская Л.Т., Переверзева В.В.* Изменчивость гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) из рек материкового побережья Охотского моря и острова Завьялова // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2013. № 1. С. 15–23.
18. *Sato S., Urawa S.* Genetic variation of Japanese pink salmon populations inferred from nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region // *Environ. Biol. Fish.* 2017. V. 100. P. 1355–1372. <https://doi.org/10.1007/s10641-017-0648-4>
19. *Podlesnykh A.V., Kukhlevsky A.D., Brykov V.A.* A comparative analysis of mitochondrial DNA genetic variation and demographic history in populations of even and odd-year broodline pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum, 1792), from Sakhalin Island // *Environ. Biol. Fish.* 2020. V. 103. P. 1553–1564. <https://doi.org/10.1007/s10641-020-01040-0>
20. *Салменкова Е.А., Гордеева Н.В., Омельченко В.Т. и др.* Генетическая дифференциация горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* Walbaum в азиатской части ареала // *Генетика.* 2006. Т. 42. № 10. С. 1371–1388.
21. *Beacham T.D., McIntosh B., MacConnachie C. et al.* Population structure of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) in British Columbia and Washington, determined with microsatellites // *Fish Bull.* 2012. V. 110. № 2. P. 242–256.
22. *Гордеева Н.В.* Высокие оценки дифференциации популяций горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* по локусу главного комплекса гистосовместимости МНС_I A1 поддерживают гипотезу “локальных стад” // *Вопр. ихтиологии.* 2012. Т. 52. № 1. С. 72–81.

23. *Tarpey C.M., Seeb J.E., McKinney G.J. et al.* Single-nucleotide polymorphism data describe contemporary population structure and diversity in allochronic lineages of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) // *Can. J. Fisheries and Aquatic Sci.* 2018. V. 75. № 6. P. 987–997.
<https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0023>
24. *Ricker W.E.* Hereditary and environmental factors affecting certain salmonid populations // *The Stock Concept in Pacific Salmon*. H.R. MacMillan Lectures in Fisheries. Vancouver: Univ. Brit. Columbia Press, 1972. P. 19–160.
25. *Алтухов Ю.П.* Популяционная генетика рыб. М.: Пищевая промышленность, 1974. 245 с.
26. *Коновалов С.М.* Популяционная биология тихоокеанских лососей. Л.: Наука, 1980. 247 с.
27. *Ivanova N.V., deWaard J., Hebert P.D.N.* An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // *Mol. Ecol. Notes.* 2006. V. 6. P. 998–1002.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x>
28. *Сошнина В.А., Павлов С.Д., Зеленина Д.А.* Генетическое разнообразие гольцов Командорских островов по результатам исследования митохондриальной ДНК // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 11. С. 1336–1341.
29. *Kearse M., Moir R., Wilson A. et al.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 12. P. 1647–1649.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
30. *Leigh J.W., Bryant D.* PopART: Full-feature software for haplotype network construction // *Methods Ecol. Evol.* 2015. V. 6. № 9. P. 1110–1116.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
31. *Clement M., Posada D., Crandall K.A.* TCS: A computer program to estimate gene genealogies // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. P. 1657–1659.
32. *Raymond M., Rousset F.* An exact test for population differentiation // *Evolution.* 1995. V. 49. № 6. P. 1280–1283.
<https://doi.org/10.2307/2410454>
33. *Excoffier L., Lischer H.E.L.* Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Res.* 2010. V. 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
34. *Животовский Л.А.* Показатель сходства популяций по полиморфным признакам // *Журн. общей биологии.* 1979. Т. 40. № 4. С. 587–602.
35. *Zhivotovsky L.A., Rosenberg N.A., Feldman M.W.* Features of evolution and expansion of modern humans inferred from genome-wide microsatellite markers // *Amer. J. Hum. Genet.* 2003. V. 72. № 5. P. 1171–1186.
<https://doi.org/10.1086/375120>
36. *George D., Mallery P.* SPSS for Windows Step by Step. Boston: Pearson, 2005. 386 p.
37. *Зеленина Д.А., Сошнина В.А., Минеева Т.М., Стоклицкая Д.С.* Внутривидовой митохондриальный полиморфизм и сравнительная филогеография тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* // *Водные биологические ресурсы России: состояние, мониторинг, управление.* Сб. материалов Всерос. науч. конф. с международным участием, посвященной 85-летию Камчатского научно-исслед. ин-та рыбного хозяйства и океанографии (3–6 октября 2017 г., Петропавловск-Камчатский). Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, 2017. С. 167–171.
<https://doi.org/10.15853/978-5-902210-51-1>
38. *Зеленина Д.А., Сошнина В.А., Сергеев А.А.* Филогеография и митохондриальный полиморфизм кижуча азиатских стад // *Мол. биология.* 2020. Т. 54. № 6. С. 997–1005.
<https://doi.org/10.31857/S0026898420060166>
39. *Vernon E.H.* Pink salmon populations of the Fraser River system // *Symp. on Pink Salmon*. Vancouver: Univ. Brit. Columbia Press, 1962. P. 53–58.
40. *Neave F.* Ocean migration of Pacific salmon // *J. Fish. Res. Board Canada.* 1964. V. 21. № 5. P. 1227–1244.
41. *Каев А.М., Животовский Л.А.* Новые данные к дискуссии о локальных и флуктуирующих стадах горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* // *Изв. ТИНРО.* 2016. Т. 187. С. 122–144.
42. *Каев А.М., Животовский Л.А.* О вероятном перераспределении горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* между районами воспроизводства разных стад // *Вопр. ихтиологии.* 2017. Т. 57. № 3. С. 264–274.
<https://doi.org/10.7868/S0042875217030080>
43. *Животовский Л.А., Глубоковский М.К.* Дальневосточная горбуша: два взгляда – два решения // *Рыбное хозяйство.* 1989. № 7. С. 57–60.
44. *Кагановский А.Г.* Некоторые вопросы биологии и динамики численности горбуши // *Изв. ТИНРО.* 1949. Т. 31. С. 3–57.
45. *Ishida T.* Salmon of the North Pacific Ocean. 2. Pink salmon in the Far East // *Bull. INPFC.* 1967. № 23. P. 9–23.
46. *Бирман И.Б.* Морской период жизни и вопросы динамики стада тихоокеанских лососей. М.: Агропромиздат, 1985. 208 с.
47. *Takagi K., An K.V., Haitt A.C., Dell M.B.* Distribution and origin of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) offshore waters of the North Pacific Ocean // *Bull. INPFC.* 1981. № 40. P. 1–196.
48. *Иванков В.Н.* О сезонных расах горбуши // *Изв. ТИНРО.* 1967. Т. 61. С. 143–151.
49. *Иванков В.Н.* Своеобразие популяционной структуры вида у горбуши и рациональное хозяйственное использование этого лосося // *Биология моря.* 1986. № 2. С. 44–49.
50. *Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т., Ефанов В.Н.* Генетическая дифференциация и популяционная структура горбуши Сахалино-Курильского региона // *Биология моря.* 1983. Т. 9. № 2. С. 46–51.
51. *Ионов А.В.* Биологическая неоднородность горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) материкового побережья Охотского моря // *Биология пресноводных рыб Дальнего Востока.* Владивосток: ДВО АН СССР, 1987. С. 35–48.
52. *Животовский Л.А., Глубоковский М.К., Викторский Р.М. и др.* Генетическая дифференциация горбуши // *Генетика.* 1989. Т. 25. № 7. С. 1261–1274.

Intra-Species Differentiation of the Asian Pink Salmon Based on the Mitochondrial *cytb* Gene

D. A. Zelenina^{a, *}, L. A. Zhivotovsky^{a, b}, V. A. Soshnina^{a, c}, O. Yu. Vilkova^a, and M. K. Glubokovsky^a

^aRussian Federal Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 107187 Russia

^bVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^cMoscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: d.zelenina@gmail.com

The study is focused on the intraspecific diversity of pink salmon. The uniqueness of this representative of the Pacific salmon of the genus *Oncorhynchus* lies in the existence of two allochronous reproductively isolated groups – even years and odd years spawning lineages. We have studied for the first time the variability of the mitochondrial cytochrome b gene (*cytb*) in all major regions of the Russian Far East. Confident genetic differentiation between lineages was shown, while no stable interregional and temporal differences were found within the lineages. The haplotype diversity within the even years spawning lineage significantly exceeded that within the odd years spawning. The differences between the “even” and “odd” pink salmon were higher than the interpopulation variability within each of the lineages.

Keywords: pink salmon, mitochondrial DNA, gene *cytb*, genetic polymorphism, intraspecific structure.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ, ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ИЗМЕНЧИВОСТЬ СИГОВ *Coregonus lavaretus sensu lato* ИЗ ВЕРХНЕГО
И СРЕДНЕГО ТЕЧЕНИЯ р. ЛЕНЫ© 2022 г. Н. А. Бочкарев¹*, Д. С. Сендек², А. В. Катохин³, Е. И. Зуйкова¹, А. Н. Матвеев⁴,
Л. А. Пестрякова⁵, Е. С. Захаров⁵, В. П. Самусёнок⁴, А. Л. Юрьев⁴, Д. В. Политов⁶¹Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630091 Россия²Государственный научно-исследовательский институт Озерного и речного рыбного хозяйства,
Санкт-Петербург, 199053 Россия³Федеральный исследовательский центр, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия⁴Иркутский государственный университет, Иркутск, 664003 Россия⁵Северо-Восточный федеральный университет, Якутск, 677980 Россия⁶Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия
*e-mail: nikson_1960@mail.ru

Поступила в редакцию 31.05.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принята к публикации 29.06.2022 г.

Представлены результаты морфогенетического анализа популяций сигов среднего течения р. Лена и симпатрических форм/видов сигов Баунтовской системы озер. Установлено, что в озерах обитают до восьми форм/видов сигов с относительно высокой степенью дифференциации. В озерах Доронг, Баунт и Б. Капылюши обитают близкие по числу жаберных тычинок, но различные по числу прободенных чешуй в боковой линии симпатрические сиги. В оз. Баунт, кроме того, обитает эндемичный ряпушковидный многотычинковый сиг. Анализ изменчивости гена *ND1* мтДНК различных форм с привлечением популяций сига из среднего течения р. Лены показал, что гаплотипы сигов Баунтовской системы озер сильно перемешаны и в своей основе имеют несколько хорошо выраженных филогенетических линий. Ряпушковидный сиг имеет более древнее происхождение по сравнению с другими видами пыжьяновидных сигов р. *Coregonus*.

Ключевые слова: симпатрические сиги, мтДНК, гаплотипы, Сибирь, река Лена, оз. Капылюши, оз. Баунт.

DOI: 10.31857/S0016675822110030

Сиговые рыбы (Teleostei: Salmoniformes: Salmonidae: Coregoninae) известны как одна из наиболее эволюционно пластичных и сложных в филогенетическом и филогеографическом отношениях групп. Среди сиговых Палеарктики наиболее широко распространены и полиморфны “настоящие” сиги комплекса *Coregonus lavaretus sensu lato*. Ранее обычно представлявшиеся в ранге внутривидовых форм [1–3], в современную эпоху как аллопатрические, так и симпатрические популяции все чаще выделяются в отдельные виды. Так, в последней сводке по пресноводным рыбам Европы приводится список из 58 видов сигов этого видового комплекса [4]. В отечественной систематике значительная часть этих видов признается [5], но чаще рассматривается в качестве подвидов, экологических форм, рас или “племен”. Так, в неко-

торых крупных водоемах севера европейской части России выделялось до десяти симпатричных внутривидовых форм сигов [1, 2]. Считается, что поддержание морфоэкологического разнообразия сигов комплекса *lavaretus* определяется специализацией популяций к разным спектрам питания, дифференциацией по числу жаберных тычинок, скорости роста и миграционного поведения. В водоемах ледовитоморского побережья Евразии малотычинковые формы сига традиционно называются пыжьяном, который был описан из бассейна р. Обь И.Г. Гмелиным как отдельный вид *Salmo (Coregonus) pidschian* (Gmelin, 1789). В более общей форме для восточно-европейских и сибирских популяций применяется термин “пыжьяновидные сиги”. Статус пыжьяна по разным авторам варьирует от видового [5] до подвидового *C. lavaretus*

pidschian (Gmelin, 1789) [1–3, 6]. В водоемах Сибири сиг-пыжьян представлен множеством аллопатрических и симпатрических речных, озерно-речных и озерных форм самой различной степени экологической и морфологической дифференциации [1, 5, 7]. Особенно выделяются морфоэкологическим разнообразием водоемы среднего и верхнего течения крупных сибирских рек – Оби [8, 9], Енисея [1, 7, 10] и Лены [7, 11–13]. Ленский сиг остается наименее изученным, хотя он чрезвычайно интересен для изучения филогенетических взаимоотношений сигов и филогеографических связей. Помимо всего эти формы/виды сигов в прошлом, вероятно, имели связь с крупнейшей древней озерной системой кайнозоя – палеобайкалом, а в настоящее время – с образовавшимися в результате орографических трансформаций водоемов Байкальской рифтовой зоны (БРЗ). Наличие в регионе крупных, существующих непрерывно значительное время (в геологическом понимании), озерно-речных систем заставляет предполагать в этом регионе наличие плейстоценовых рефугиумов.

В последние десятилетия прогресс в изучении статуса и эволюционных взаимоотношений сигов связан с применением молекулярно-генетических маркеров. Анализ паттернов морфологической изменчивости сигов, особенно связанной с быстро эволюлирующими трофическими и двигательными характеристиками, показал, что за фенотипической дифференциацией может стоять выраженная генетическая [14–22], но может наблюдаться и обратная картина – практическое отсутствие различий в частотах генов и эпигенетические особенности, обусловленные дифференциальной экспрессией регуляторных генов [23]. Из симпатрических речных форм Сибири изучены малотычинковые сиви из бассейна р. Енисей, известные под названиями сиг Исаченко, или енисейский речной (горбоносый) сиг *C. fluviatilis* Issatchenko и восточносибирский сиг *C. lavaretus pidschian natio brachymystax* Smitt. Эти сиви хорошо различаются как по морфологическим признакам [1, 24, 25], так и по митохондриальной ДНК [26]. Между парой симпатрических сигов из р. Анадырь – горбуном (пыжьян) *C. (l.) pidschian* и востряком (*C. anaulorum* Kaganowsky in Berg) также наблюдаются существенные различия по морфологическим признакам [6, 27, 28] и наличие нескольких хорошо дифференцированных линий мтДНК [29, 30]. Симпатрические сиви из р. Амур *C. chadary* и *C. ussuriensis* хорошо дифференцированы по меристическим признакам, однако по мтДНК различия между ними менее значительны [29, 30]. К симпатрическим сигам из низовьев рек Сибирской Арктики относятся вышеупомянутый восточносибирский, а также и ледниково-равнинный сиг *C. lavaretus pidschian n. glacialis* Kirillov, которые сильно дифференцированы генетически [30–32].

В водоемах Евразии симпатрических пар или “букетов” озерных сигов намного больше, чем речных. Многие симпатрические сиви населяют озера Альп [33, 34] и Фенноскандии [2, 35–37], однако существенной генетической дифференциации между формами европейских сигов не обнаружено, даже для тех, для которых признан видовой статус [38, 39].

В Сибири озерных форм сигов, обитающих симпатрично и различающихся по темпу роста, структуре питания, положению рта и числу жаберных тычинок, гораздо меньше. Например, в оз. Байкал описаны близкие к комплексу *lavaretus* (а не к арктическому омулю *C. autumnalis*) байкальский омуль *C. migratorius* и его близкий родственник озерный сиг *C. baicalensis*, а также байкальский озерно-речной сиг (так же известный как *C. fluviatilis*) [18, 19, 40, 41]. Симпатрические сиви обитают в Телецком озере (бассейн верхнего течения р. Обь) [8], в озерах Тоджинской котловины (верхнее течение р. Енисей) и в оз. Орон (бассейн р. Витим) [7, 11, 42]. Наибольшим разнообразием сигов характеризуется Баунтовская система озер бассейна р. Витим (озера Доронг, Большие и Малые Капылюши, Баунт), где насчитывают до восьми форм/видов сигов [7, 12, 43, 44]. В оз. Баунт можно выделить следующие формы/виды: 1) ряпушковидный среднечешуйчатый сиг из оз. Баунт (в некоторых источниках баунтовская ряпушка *C. sardinella baunti*) [45] – в Аннотированном каталоге (1998 г.) эта форма/вид включена в состав сибирской ряпушки в качестве подвида *C. sardinella*; 2) среднечешуйчатый малотычинковый сиг из оз. Баунт, внешне почти не отличимый от сигов из р. Витим; 3) малотычинковый и многочешуйчатый пыжьяновидный сиг из оз. Баунт, по морфологическим признакам идентичный малотычинковому сигу из оз. Капылюши, которого было предложено выделить в отдельный вид *Coregonus skrjabini* [12]; 4) среднечешуйчатый сиг обнаружен в оз. Баунт относительно недавно [16]; 5) малотычинковый и среднечешуйчатый пыжьяновидный сиг из оз. Доронг; 6) мелкий среднечешуйчатый и среднечешуйчатый сиг из оз. Доронг; 7) среднечешуйчатый и многочешуйчатый сиг из озер Большие и Малые Капылюши, который имеет общепризнанный видовой/подвидовой статус – баунтовский сиг (*C. baunti*, Muchomediarov или *C. lavaretus baunti*); 8) малотычинковый и многочешуйчатый сиг из оз. Б. Капылюши, обозначаемый в литературе как сиг-пыжьян. В оз. Орон были обнаружены симпатрические сиви, близкие по форме тела и меристическим признакам к сигам из озер Доронг и Баунт. Главное их отличие от сигов из оз. Баунт наблюдается по несколько меньшему числу прободенных чешуй в боковой линии. В результате исследований были описаны одна малотычинковая и две среднечешуйчатые формы/вида. При этом

среднетычинковым сигам Ю.Е. Калашников предложил присвоить собственные названия *C. l. baunti* и *C. l. oronensis* [11]. Малотычинковый и малочешуйчатый сиг был отнесен к *C. l. pidschian*. Однако детальной таксономической ревизии этих форм/видов не проводилось. Очевидно, что эти формы/виды тесно связаны с сигами из Баунтовских озер.

Анализ фрагмента мтДНК ND-1 не выявил между формами/видами сигов из озер Доронг и Баунт существенных различий. По-видимому, исследованные группировки представляют собой результат гибридизации нескольких филогенетических линий сигов, и при этом их гаплотипы перемешаны как между формами/видами, так и между водоемами. В то же время анализ мтДНК и аллозимов “баунтовской ряпушки” из оз. Баунт показал, что она относится не к ряпушкам, а к древней филогенетической линии, близкой к группе пыжьяновидных сигов байкальского происхождения [16, 30, 46].

На происхождение форм/видов сигов из Баунтовской системы озер существует несколько альтернативных точек зрения. Согласно первой, все эти формы/виды сформировались в тех озерах, где они обитают в настоящее время. Считается, что причинами их формирования являются уникальные геологические и экологические условия региона, в частности наличие термальных источников, которые повышают среднегодовые температуры в оз. Баунт [7, 12, 42]. Г.Л. Карасев [12] полагал, что весенненерестующие сиги являются наиболее древними. Согласно другой точке зрения, большая часть форм/видов сигов из Баунтовской системы озер могла сформироваться в результате постледникового расселения и гибридизации [47]. И, наконец, Ю.С. Решетников полагает, что среднетычинковые формы сигов из Баунтовской системы озер (за исключением *C. l. baunti*) являются производными сига Палласа (*C. l. pallasii*), а ряпушковидный сиг является озерной формой сибирской ряпушки (*C. sardinella*) [3].

Цель работы – анализ филогенетических и филогеографических связей между современными симпатрическими формами/видами сигов из Баунтовской системы озер и верхнего течения р. Лена. На основании морфологического и генетического анализа предложена гипотеза их происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика района работ

В работе были использованы выборки сигов комплекса *C. lavaretus sensu lato*: из бассейна р. Лены (верхняя Лена) (59°39' с.ш., 112°55' в.д.), р. Марха, бассейна р. Виллой (левый приток Лены) (65°06' с.ш., 116°42' в.д.), из устья р. Буотама

(61°14' с.ш., 128°34' в.д.) – правого притока среднего течения р. Лены (рис. 1). В группировку сигов из р. Витим были включены выборки из самой р. Витим и оз. Орон (Орон Витимский) (57°07' с.ш., 116°32' в.д.), а также ряд форм/видов сигов из Баунтовской (Ципо-Ципиканской) системы озер (рис. 1, врезка), которая расположена в северо-западной части Витимского нагорья Байкальской рифтовой зоны; оз. Б. Токо бассейна р. Алдан, правого притока р. Лена (56°02' с.ш., 130°52' в.д.). Озеро Доронг (55°17' с.ш., 112°16' в.д.) представляет собой узкий вытянутый водоем с крутыми берегами, связанный с оз. Баунт реками Тоца и В. Ципа. Озеро Доронг находится на водоразделе бассейнов оз. Байкал и р. Витим на высоте 1107 м. Озеро Б. Капылюши (54°47' с.ш., 112°10' в.д.) расположено у подножья горы Бурпала (1588 м) на высоте 1175 м над уровнем моря. Через протоку длиной около 600 м оз. Б. Капылюши соединяется с оз. М. Капылюши; берега озер пологие, с хорошо выраженными песчано-галечными пляжами. Озеро М. Капылюши связано с оз. Баунт через извилистую протоку с заморными Окуневыми озерами, и р. Ципикан, которая характеризуется обилием порогов и перекатов. Наиболее крупное озеро Баунт (55°27' с.ш., 113°14' в.д.) лежит у подножья вулкана Большой Хаптон и связано с Витимом р. Н. Ципа.

Ихтиофауна

В реках Лена, Виллой и Алдан обитают обычные для этих мест виды рыб, в том числе и восточносибирский сиг-пыжьян [13, 48]. Видовой состав рыб из Баунтовских озер относительно беден. Помимо сиговых рыб в этой системе озер обитают: в оз. Доронг – байкало-ленский хариус *Thymallus baicalolenensis* Matveev, Samusenok, Pronin et Tel'pukhovsky, острорылый ленок *Brachymystax lenok* (Pallas, 1773), щука *Esox lucius* Linnaeus, 1758, окунь *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758, ерш *Gymnocephalus cernuus* (Linnaeus, 1758), елец *Leuciscus leuciscus* (Linnaeus, 1758), речной голянь *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) и налим *Lota lota* (Linnaeus, 1758). Наиболее многочисленны в озере малотычинковые и среднетычинковые среднечешуйчатые сиги. В озерах Большие и Малые Капылюши отмечены те же самые виды, что и в оз. Доронг, а также плотва *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758), но отсутствуют ленок и хариус. Здесь наиболее многочисленны много- и среднетычинковые многочешуйчатые симпатрические сиги, которые помимо числа тычинок, различаются формой головы (рис. 1). В озере Баунт обитают таймень *Hucho taimen* (Pallas, 1773), щука, плотва, язь *Leuciscus idus* (Linnaeus, 1758), елец, речной голянь, окунь, ерш, налим. Иногда встречается осетр *Acipenser baeri*, Brandt, 1869. В пойме обитает серебряный карась *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782). Наиболее

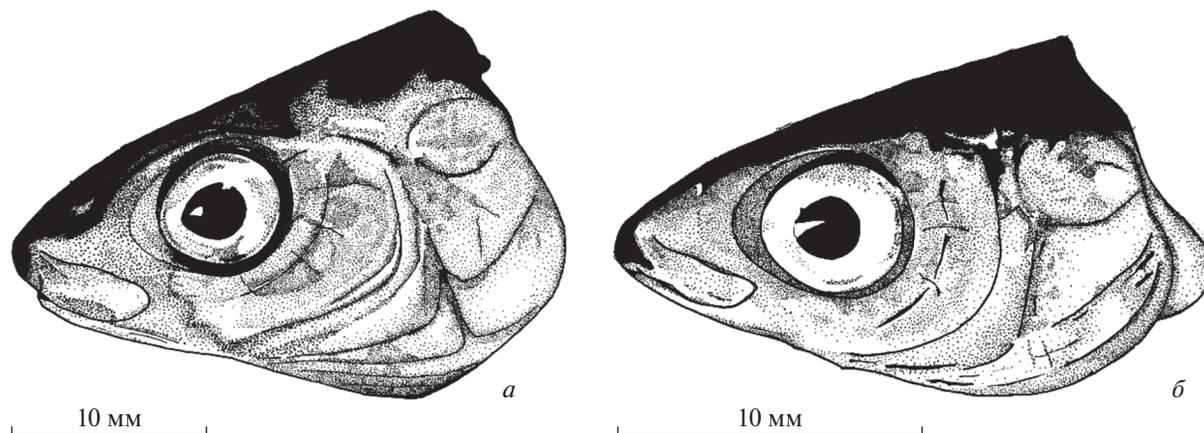


Рис. 1. Головы сегов из озера Б. Капылюши (а) малотычинковый пыжьяновидный сиг. (б) *C. baunti*, Muchomediarov, или *C. lavaretus baunti* (в зависимости от взглядов). Рисунок Н.А. Бочкарева.

многочисленным видом в озере является баунтовский ряпушковидный сиг.

Сбор материала и морфологический анализ

Лов различных форм/видов сегов в реках и озерах проводили в летний период. В озерах Баунт и Доронг лов проводили в 2009 и 2010 г. сетями с ячейей от 18 до 35 мм. В оз. Б. Капылюши сегов ловили в середине августа 2011 г. сетями с ячейей от 12 до 40 мм на глубинах от 2 до 20 м. В р. Марха, верхнем течении Лены и в устье р. Буотама для сборов материала применяли закидной “тугунковый” невод. В оз. Б. Токо применяли жаберные сети с ячейей 22–40 см. В данной статье мы использовали 12 выборок, принадлежащих к различным формам/видам сегов из восьми различных водоемов бассейна р. Лена (табл. 1, рис. 2).

Для сбора морфологических данных сразу после лова рыбу с расправленными плавниками выкладывали на пенополиуретановый коврик и фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата Nikon D500. Взвешивание особей, подсчет прободенных чешуй в боковой линии и жаберных тычинок проводили одновременно с фотографированием. Измерение рыб проводили по фотографиям в лаборатории с помощью программы AxioVision 3.1 [49, 50]. Чтобы устранить размерную изменчивость, значение каждого признака делили на среднее геометрическое всех промеров [51, 52]. Полученное значение логарифмировали. Для визуальной оценки различий был построен график распределения особей.

Меристические данные проверили на нормальность. Поскольку в соответствии с *F*-критерием Левена дисперсии были примерно одинаковы ($p > 0.05$), то для сравнения средних использовали

Таблица 1. Места сбора и объем исследованного материала

№	Форма/вид	Водоем	<i>N</i>	<i>NDI(n)</i>
1	Восточносибирский сиг	Р. Лена, верхн. течение	15	10
2	Восточносибирский сиг	Р. Марха	18	9
3	Восточносибирский сиг	Р. Буотама, устье	26	10
4	Восточносибирский сиг	Р. Витим	25	5
5	Восточносибирский сиг	Оз. Б. Токо	12	11
6	<i>Coregonus baunti</i>	Оз. Б. Капылюши	44	11
7	Малотычинковый сиг	Оз. Б. Капылюши	45	11
8	Малотычинковый сиг	Оз. Доронг	67	11
9	Среднетычинковый сиг	Оз. Доронг	12	10
10	Ряпушковидный сиг	Оз. Баунт	26	6
11	Пыжьяновидный сиг	Оз. Баунт	59	4
12	Среднетычинковый сиг	Оз. Баунт	9	3

NDI(n) – число образцов, типированных на мтДНК.

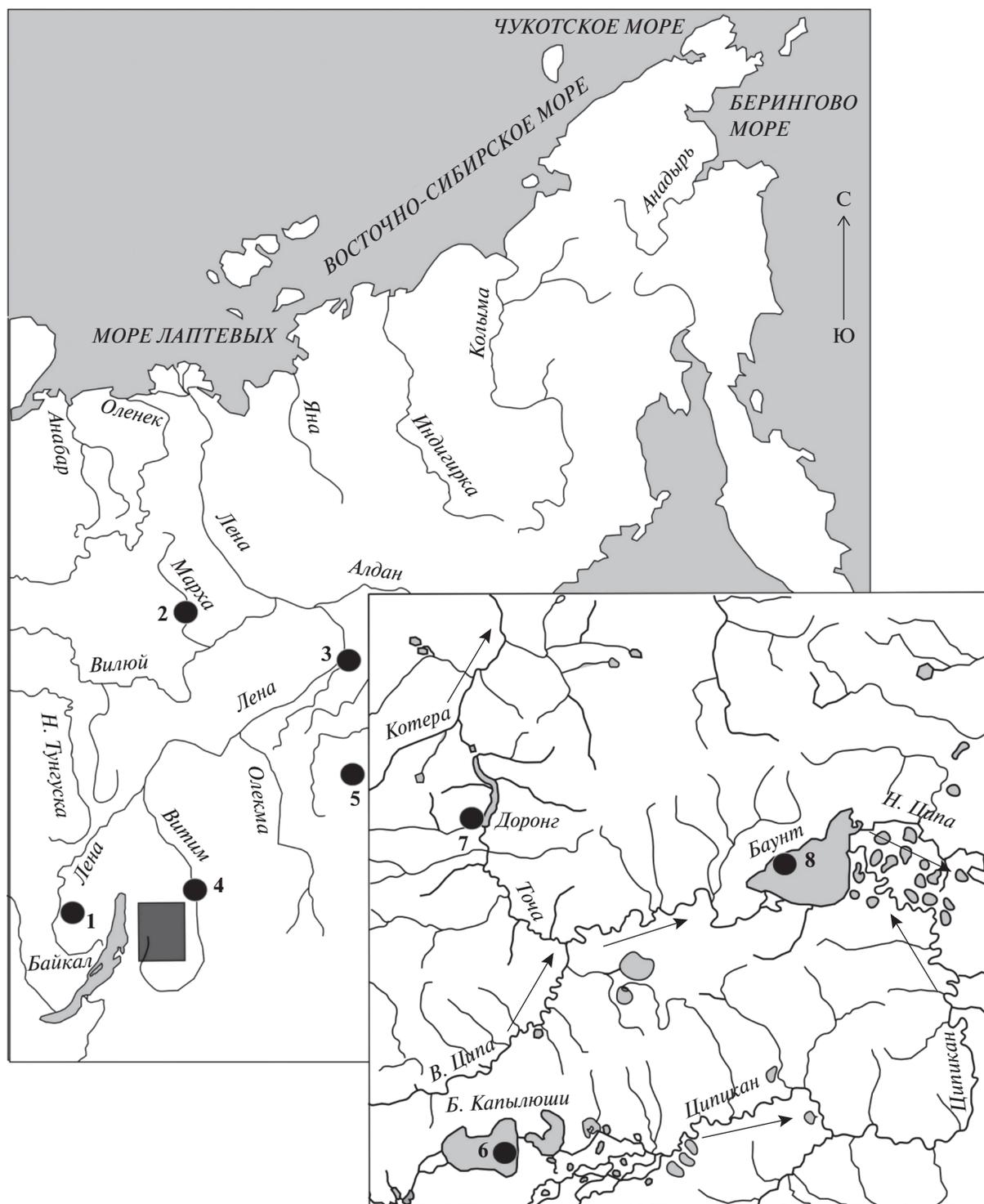


Рис. 2. Карта-схема Баунтовской системы озер. Места лова рыб. 1 – В. Лена, 2 – р. Марха, 3 – р. Бутама, 4 – оз. Б. Токо, 5 – р. Витим, 6 – оз. Б. Капылюши (две выборки), 7 – оз. Доронг (две выборки), 8 – оз. Баунт (три выборки). Стрелками показано направление течения рек.

однофакторный дисперсионный анализ вместе с апостериорным критерием Тьюки HSD для неравных по размеру выборок. Оценку достоверности между выборками по пластическим признакам

проводили с помощью многомерного дисперсионного анализа MANOVA. Для статистической обработки использовали статистический пакет PAST [53].

Таблица 2. Характеристика исследованных форм/видов сигов по меристическим признакам. Номера гаплотипов в NCBI

№ ¹	<i>sp.br.</i>	<i>l.l.</i>	Номер доступа последовательностей в GenBank
1	21.3 ± 0.76	80.20 ± 0.78	KM013418–KM013424, MT862526, MT862535
2	20.13 ± 0.46	81.26 ± 0.52	KM013405–KM013409, MT862525
3	19.39 ± 0.37	80.88 ± 0.85	MT862527–MT862533
4	21.80 ± 0.44	81.12 ± 0.60	OK018185–OK018189*
5	21.08 ± 0.72	81.06 ± 0.63	KM013410–KM013417, MT862534
6	35.52 ± 0.29	93.39 ± 0.46	KC339252–KC339263*
7	22.83 ± 0.23	94.32 ± 0.48	KC339264–KC339274*
8	22.04 ± 0.27	84.46 ± 0.65	JN629005, JN629006, MW741833–MW741836
9	32.58 ± 0.72	84.00 ± 0.86	JN629010–JN629013, MW741829–MW741832
10	43.22 ± 0.44	82.87 ± 0.34	JN629014–JN629024
11	22.13 ± 0.21	85.07 ± 0.38	JN629001–JN629004
12	33.33 ± 0.67	83.33 ± 0.97	JN629007–JN629009

Примечание. Номера популяций соответствуют приведенным в табл. 1. *sp.br.* – число жаберных тычинок на первой дуге ($X \pm m$). *l.l.* – число прободенных чешуй в боковой линии ($X \pm m$). Звездочками обозначены сиквенсы, сделанные для настоящей работы.

Анализ мтДНК

Геномную ДНК выделяли фенольно-хлороформным методом из фиксированной 96% этанолом печени сигов. Нами проведен анализ изменчивости фрагмента гена митохондриальной ДНК (мтДНК), включающий гены 16S-RNA-tRNA-Leu-ND1-tRNA-Ile-tRNA-Gln, амплифицированного в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием внешних праймеров LGL381 и LGL563 и трех пар внутренних праймеров [26, 40, 54]. Продукты ПЦР очищали с помощью набора реактивов “БИОСИЛИКА” (Новосибирск, Россия) и секвенировали по Сэнгеру по прямому и обратному праймерам с использованием BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) на ДНК-анализаторе ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc., США) в ЦКП “Геномика” СО РАН (Новосибирск, Россия, <http://sequest.niboch.nsc.ru>). Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью алгоритма ClustalW и редактировали вручную. Оригинальные нуклеотидные последовательности депонировали в международную базу данных GenBank (табл. 2). Для анализа генетического полиморфизма вычисляли: число полиморфных (сегрегирующих) сайтов (*S*), число гаплотипов (*h*), гаплотипическое разнообразие (*Hd*), нуклеотидное разнообразие (π), среднее число нуклеотидных различий (*k*). Расчеты выполнялись в программе DnaSP v.5.10 [55]. Для оценки степени межпопуляционной дифференциации в программе ARLEQUIN v.3.5 [56] были рассчитаны парные значения F_{ST} при 10000 репликаций. Для оценки нейтральности эволюции были использованы тесты Таджимы (Tajima’s *D*) и Фу (Fu’s *FS*) [57, 58]. Статистическая значимость результатов была вы-

числена при 10000 репликаций. Для выявления демографических параметров были построены гистограммы распределения попарных различий (mismatch distributions, MMD) [59]. Для анализа гипотезы популяционной экспансии оценивали среднестатистическое отклонение (SSD) и индекс Харпендинга (*r*) [60]. Для оценки генеалогических связей между гаплотипами предполагаемых форм/видов сигов построили медианную сеть в программе Network v.4.5 с помощью алгоритма медианного связывания (median-joining) [61].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология

Все популяции/формы/виды сигов из бассейна р. Лена (ее верхнего и среднего течения) по количеству прободенных чешуй в боковой линии (*l.l.*) делятся на малочешуйчатые, среднечешуйчатые и многочешуйчатые. Число чешуй варьирует от 76 до 83 у малочешуйчатых, от 83 до 86 у среднечешуйчатых и от 86 до 102 у многочешуйчатых сигов. К малочешуйчатым популяциям/формам/видам сигов относятся все речные сиви бассейна р. Лена, сиви из оз. Б. Токо. Симпатрические сиви из озер Доронг и Баунт можно отнести к среднечешуйчатым сигам. К многочешуйчатым сигам относятся только симпатрические сиви из оз. Б. Капылюши (рис. 3). По числу прободенных чешуй в боковой линии речные сиви и сиви оз. Б. Токо не различаются друг от друга. При сравнении речных популяций сига с выборками многочешуйчатых сигов из оз. Б. Капылюши и выборками сигов из озер Доронг и Баунт почти во всех случаях обнаруживались достоверные различия.

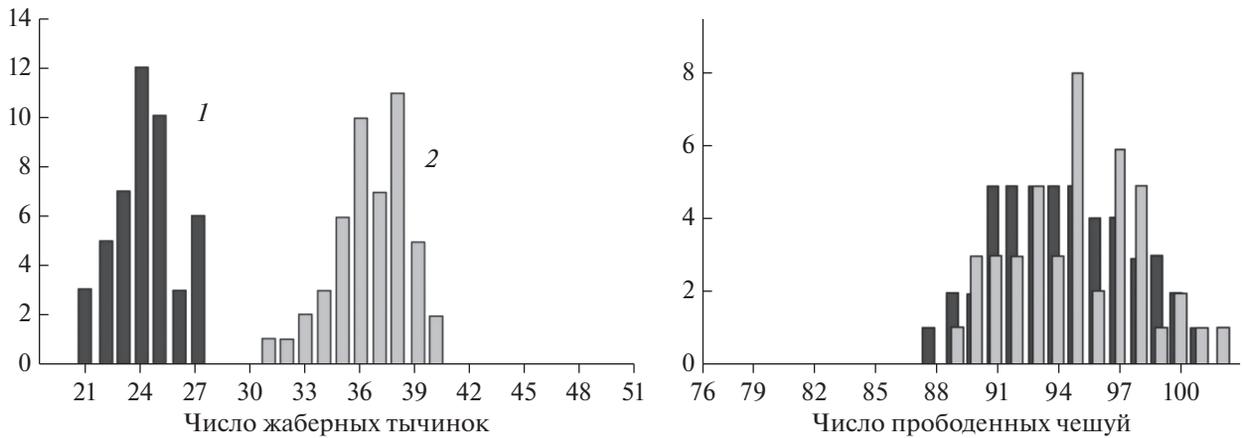


Рис. 3. Распределение числа жаберных тычинок и прободенных чешуй в боковой линии у симпатрических сигов оз. Б. Капылюши. 1 – малотычинковый сиг, 2 – среднетычинковый сиг оз. Б. Капылюши (*C. baunti*).

По числу жаберных тычинок (*sp.br.*) сиги из исследованного региона подразделялись на малотычинковых (*sp.br.* 18–27) и среднетычинковых (*sp.br.* 27–35), ряпушковидного баунтовского сига, можно отнести к многотычинковым сигам (рис. 3). По количеству жаберных тычинок речные малотычинковые сиги бассейна р. Лена и малотычинковые сиги из всех озер отличаются друг от друга незначительно, но достоверно отличаются от всех среднетычинковых сигов и баунтовского ряпушковидного сига. Среднетычинковые сиги из озер Доронг, Баунт и Б. Капылюши по числу жаберных тычинок хоть и принадлежат к одной группе, но среднетычинковые сиги из оз. Б. Капылюши и оз. Доронг достоверно различаются друг от друга (табл. 3).

Дендрограмма сходства по пластическим признакам показывает структурированность выборок в виде двух кластеров (I и II). В кластер I во-

шли *C. baunti* из оз. Б. Капылюши и баунтовский ряпушковидный сиг (табл. 1). Кластер II состоит из двух ветвей (а) и (б). Ветвь (а) включает в себя среднечешуйчатых сигов из озер Баунт и Доронг и малотычинкового сига из оз. Б. Капылюши (рис. 4). Ветвь (б) включает в себя выборки малотычинковых сигов из оз. Доронг и Баунт и всех малотычинковых сигов из бассейнов рек Лена и Витим (табл. 1). Многомерный дисперсионный анализ (MANOVA) по пластическим признакам показал, что выборки хорошо дифференцированы ($Wilk's \Lambda = 0.0004378$, $F = 10.04$ $d.f.1 = 352$, $d.f.2 = 3213$) и достоверно отличаются друг от друга ($p < 0.001$) (табл. 4). Парное сравнение показало, что ряпушковидный сиг достоверно отличается от остальных сигов. Среднетычинковые сиги отличаются почти от всех малотычинковых сигов, симпатричных с ними. Малотычинковые речные сиги разных популяций слабо дифферен-

Таблица 3. Парное сравнение исследованных популяций сига-пыжьяна числа прободенных чешуй в боковой линии (выше диагонали) и жаберных тычинок (ниже диагонали) по средневзвешенному критерию Тьюки

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	—	1.000	1.000	0.999	0.999	0.000	0.000	0.001	0.006	0.222	0.000	0.065
2	0.186	—	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.015	0.069	0.688	0.001	0.351
3	0.126	1.000	—	1.000	1.000	0.000	0.000	0.019	0.085	0.737	0.002	0.399
4	1.000	0.023	0.013	—	1.000	0.000	0.000	0.034	0.132	0.833	0.004	0.514
5	1.000	0.258	0.181	0.999	—	0.000	0.000	0.028	0.115	0.803	0.003	0.475
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—	0.999	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.529	0.000	0.000	0.941	0.424	0.000	—	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—	1.000	0.902	1.000	0.993
9	0.996	0.006	0.003	1.000	0.987	0.000	0.992	0.000	—	0.992	0.995	1.000
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—	0.523	1.000
11	0.956	0.001	0.001	1.000	0.915	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	—	0.839
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.064	0.000	0.000	0.000	0.387	0.000	—

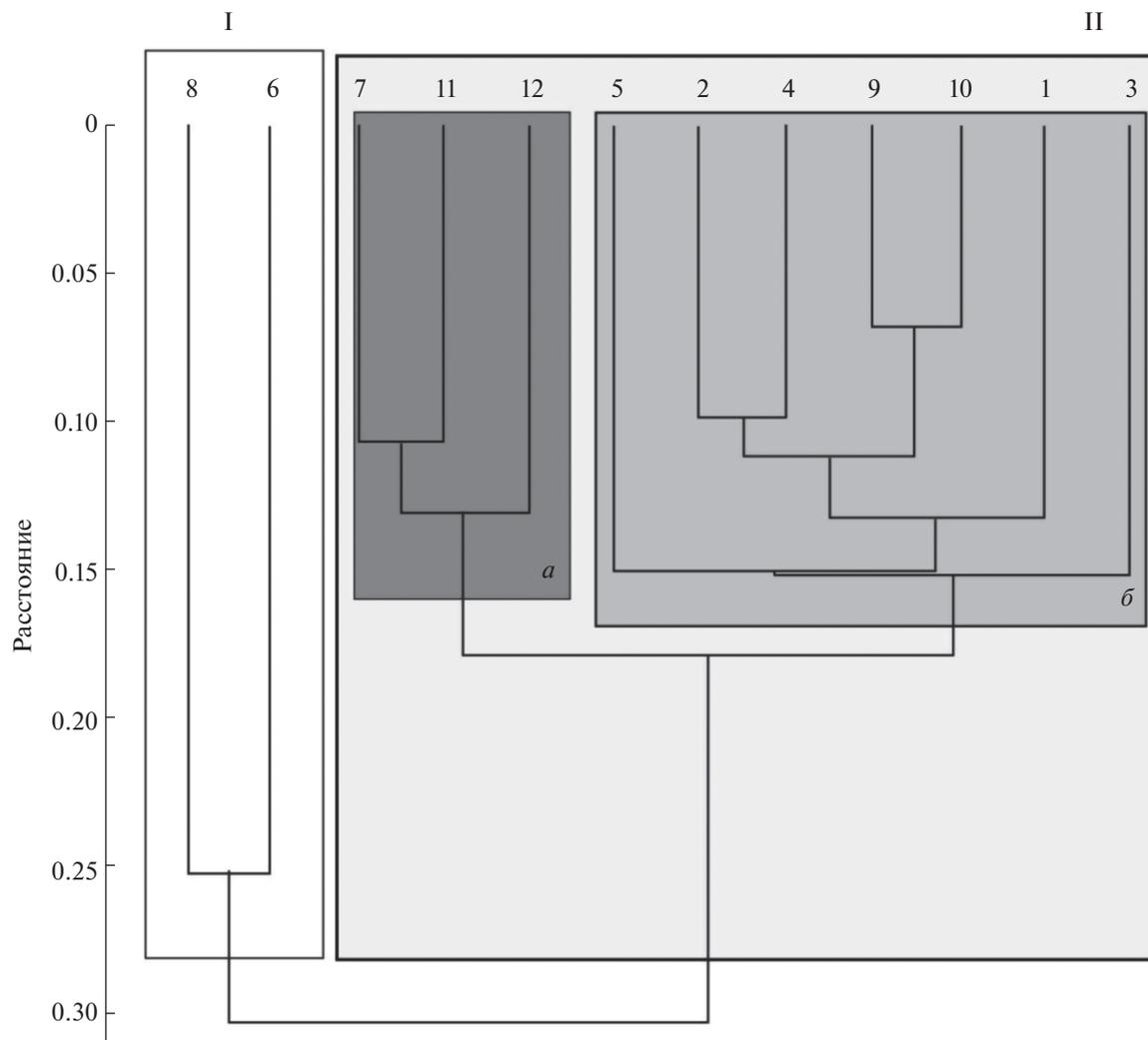


Рис. 4. UPGMA-дендрограмма популяций сига верхнего и среднего бассейна р. Лена по пластическим признакам (обозначения как в табл. 1).

цированы друг от друга, но, как правило, отличаются от соответствующих симпатрических с ними озерных сига.

Митохондриальная ДНК

Наибольший вклад в изменчивость фрагмента 16S-RNA-tRNA-Leu-ND1-tRNA-Phe-tRNA-Gln мтДНК вносит изменчивость белок-кодирующего гена *ND1*, остальные участки более консервативны. Все рассматриваемые популяции сига из бассейна р. Лена характеризуются высокими показателями генетического полиморфизма *ND1*. Максимальные значения обнаружены у ряпушковидного сига. У *S. baunti* из оз. Б. Капылюши зарегистрированы одни из самых низких показателей генетического полиморфизма.

Реконструкция генеалогических взаимоотношений между популяциями сига из водоемов

Баунтовской системы озер, верхнего и среднего течения р. Лена выявила три основные гаплогруппы (рис. 5). В гаплогруппу I вошла часть гаплотипов симпатрических сига из озер Б. Капылюши и Баунт, часть гаплотипов малотычинкового сига из верхнего течения р. Лена, устья р. Буотама, р. Витим и все гаплотипы сига из оз. Б. Токо. Вторая гаплогруппа удалена от первой на два мутационных шага и включает в себя остальные гаплотипы вышеперечисленных группировок. Гаплогруппа III сформирована гаплотипами ряпушковидного сига. Группа гаплотипов (Н3, Н4, Н6, Н7, Н13, Н14, Н18, Н21, Н22, Н29, Н33, Н34) из популяций сига из рек Марха, Витим и верхнего течения р. Лена удалена от трех выделенных гаплогрупп и по структуре представляет собой цепь. В составе гаплогрупп I и II отмечено несколько звездообразных структур (с центральными гаплотипами Н2, Н8, Н16, Н33, Н35). Звездообразные структуры

Таблица 4. Попарное сравнение выборок (MANOVA) по пластическим признакам (значения *p*)

№	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.9230	—	0.9652	—	0.0000	0.0001	0.8082	—	0.0000	0.0000	—
2		0.9846	0.1770	0.4325	0.0000	0.0000	0.0405	0.2702	0.0000	0.0000	0.8069
3			0.9550	—	0.0000	0.0000	0.9134	—	0.0000	0.0018	—
4				0.3426	0.0000	0.0000	0.0059	0.2964	0.0000	0.0000	0.8979
5					0.0000	0.0001	0.2809	—	0.0000	0.0000	—
6						0.0000	0.0000	0.0094	0.0000	0.0000	0.0027
7							0.0000	0.0056	0.0000	0.0000	0.0207
8								0.5101	0.0000	0.0471	0.9619
9									0.0000	0.0000	—
10										0.0000	0.0000
11											0.036

Таблица 5. Иерархический анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) для изученных форм/видов сига (1–12) и по объединенным группам (малотычинковых и среднетычинковых)

Уровни иерархии	<i>df.</i>	Процент изменчивости	Индексы фиксации (<i>p</i>)
Между группами	10	17.02	0.17016 (0.080)
Между популяциями внутри групп	2	10.26	0.12358 (0.000***)
Внутри популяций	86	72.73	0.27271 (0.020*)
По двум группам мало- и среднетычинковых форм/видов сига			
Между группами	1	4.26	0.25864 (0.000***)
Между популяциями внутри групп	11	24.76	0.29026 (0.000***)
Внутри популяций	86	70.97	0.04264 (0.184)

* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

первой гаплогруппы связаны между собой множеством альтернативных связей разной длины, которые означают, как правило, вероятность обратных или параллельных мутаций. Каждая структура характеризуется наличием множества минорных гаплотипов, удаленных от центрального на один–три мутационных шага. В центре гаплогруппы I расположен гаплотип H16, обнаруженный в популяции сига из р. Лена. Вторая гаплогруппа имеет более простое строение и состоит из двух звездообразных структур с множеством минорных гаплотипов, удаленных от центрального на один–два мутационных шага. Третья гаплогруппа включает в себя сеть гаплотипов ряпушковидного сига из оз. Баунт. Оригинальная часть гаплогруппы III связана с гаплогруппой I через восемь мутационных шагов и двух гипотетических гаплотипов (рис. 5). Дистантная часть гаплогруппы III связана с гаплогруппой I через общий гипотетический гаплотип.

По распределению основных гаплотипов в бассейне средней и верхней Лены видно, что гаплотипы сига сильно перемешаны (рис. 6). Толь-

ко гаплотипы сильно дивергировавшего ряпушковидного сига отмечены в единственном водоеме – озере Баунт.

Для анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) были сформированы группы согласно географическому распределению и формам/видам (табл. 5), а также по экологическим характеристикам (малотычинковых и среднетычинковых) сига из разных озер. Ряпушковидный сиг, как генетически удаленный, в этот анализ не включен. При проведении анализа по 11 выборкам было показано, что внутригрупповая изменчивость преобладает во всех сравнениях – 70.97–72.73% (табл. 5). Внутригрупповая генетическая дифференциация для экологической модели показала относительно высокую долю изменчивости – 24.76% при низких значениях индекса фиксации. При изменении состава групп результаты практически не изменялись.

Гаплотипы сига из оз. Б. Токо формируют собственную звездообразную структуру (H7–H14), тесно связанную с другой звездообразной структурой (H16) (рис. 6). В бассейне р. Витим гап-

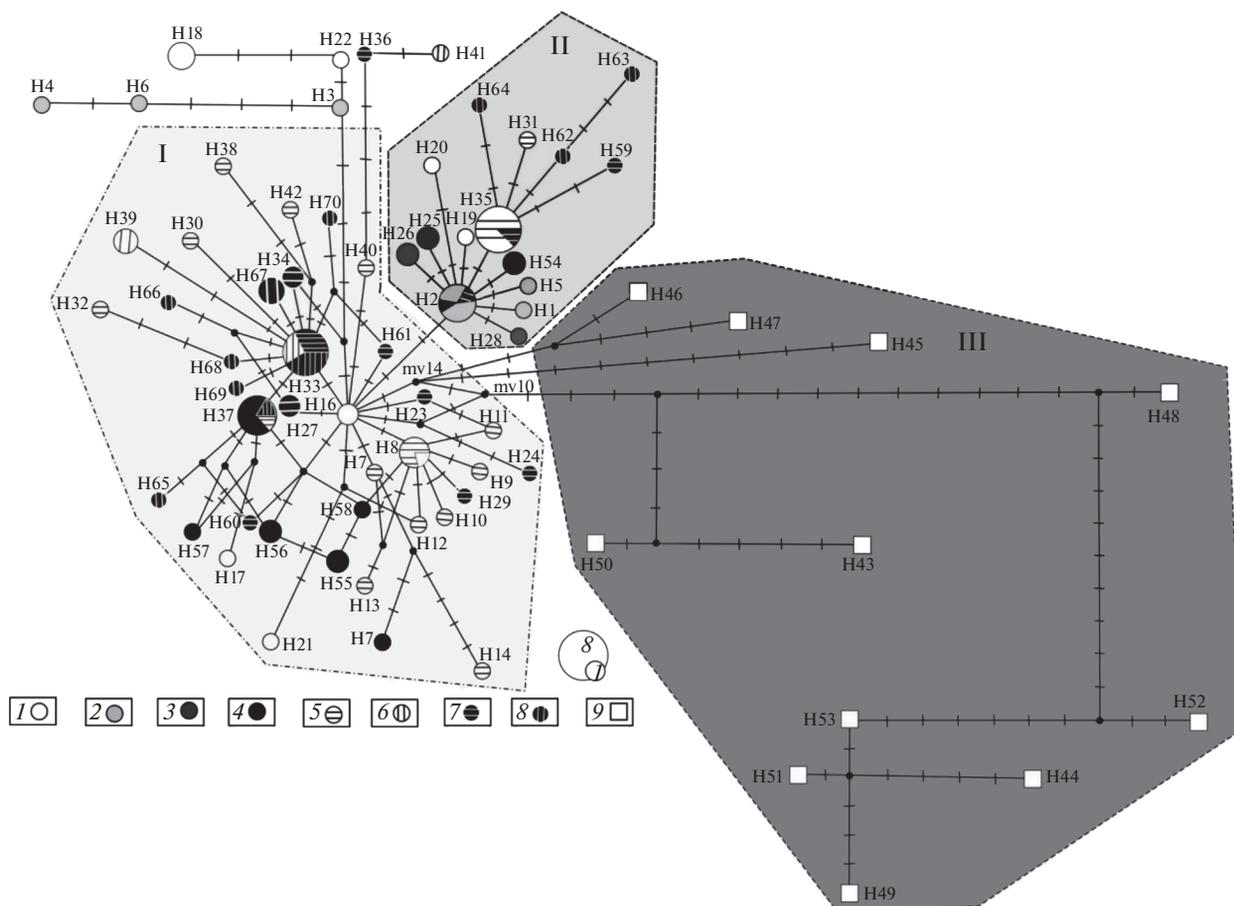


Рис. 5. Медианные сети гаплотипов (16S rRNA-tRNA-Leu-NADH1-tRNA-Ile-tRNA-Gln мтДНК) сигов верхнего и среднего течения р. Лена. Размер узла пропорционален частоте встречаемости гаплотипа. I–III – гаплогруппы. Выборки как в табл. 1. 9 – ряпушковидный сиг.

типы сигов из оз. Б. Токо не отмечены, однако в озере встречались гаплотипы сигов из верхней Лены. Во всех точках присутствуют гаплотипы, которые формируют рассеянные слабо связанные сети. Такая структура характерна для арктических видов/форм сигов, известных как *C. pidschian* n. *glacialis*. Так в оз. Орон (Витимский) такие гаплотипы были доминирующими.

Тест Таджиды D в большинстве случаев принимает отрицательные и недостоверные значения. Исключение составляет выборка *C. baunti*, которая характеризуется положительными значениями (табл. 6). Достоверные значения были получены для выборок сигов из оз. Б. Токо, р. Лена, для выборки малотычинкового сига из оз. Б. Капылюши и малотычинкового сига из оз. Доронг. Тест Фу FS для сигов из оз. Б. Токо, малотычинковых сигов из озер Б. Капылюши и Доронг характеризовался отрицательными достоверными значениями. Тест на нейтральность эволюции для всей выборки сигов продемонстрировал отрицательные и достоверные значения по обоим параметрам.

Попарное сравнение выборок выявило в основном низкие, редко средние и высокие значения F_{ST} между изучаемыми группировками (от 0.00089 до 0.52092). Относительно высокие значения, как правило, связаны с географически удаленными популяциями сигов из оз. Б. Токо, бассейнов рек Алдан и Марха (связь с ряпушковидным сигом не анализировали). Согласно индексу суммы квадратичного отклонения (SSD_{obs}) и индекса Харпендинга (r) обе модели демографической и пространственной экспансии оказались равноценными, оба показателя были недостоверны. Анализ наблюдаемого и ожидаемого распределения числа попарных нуклеотидных различий показал, что кривые имеют различный характер распределения (рис. 7, а, б). Показано, что для выборки сигов верхнего течения р. Лена характерно унимодальное распределение, тогда как озерные группировки сигов демонстрировали мультимодальную форму кривой распределения (рис. 7, б, в).

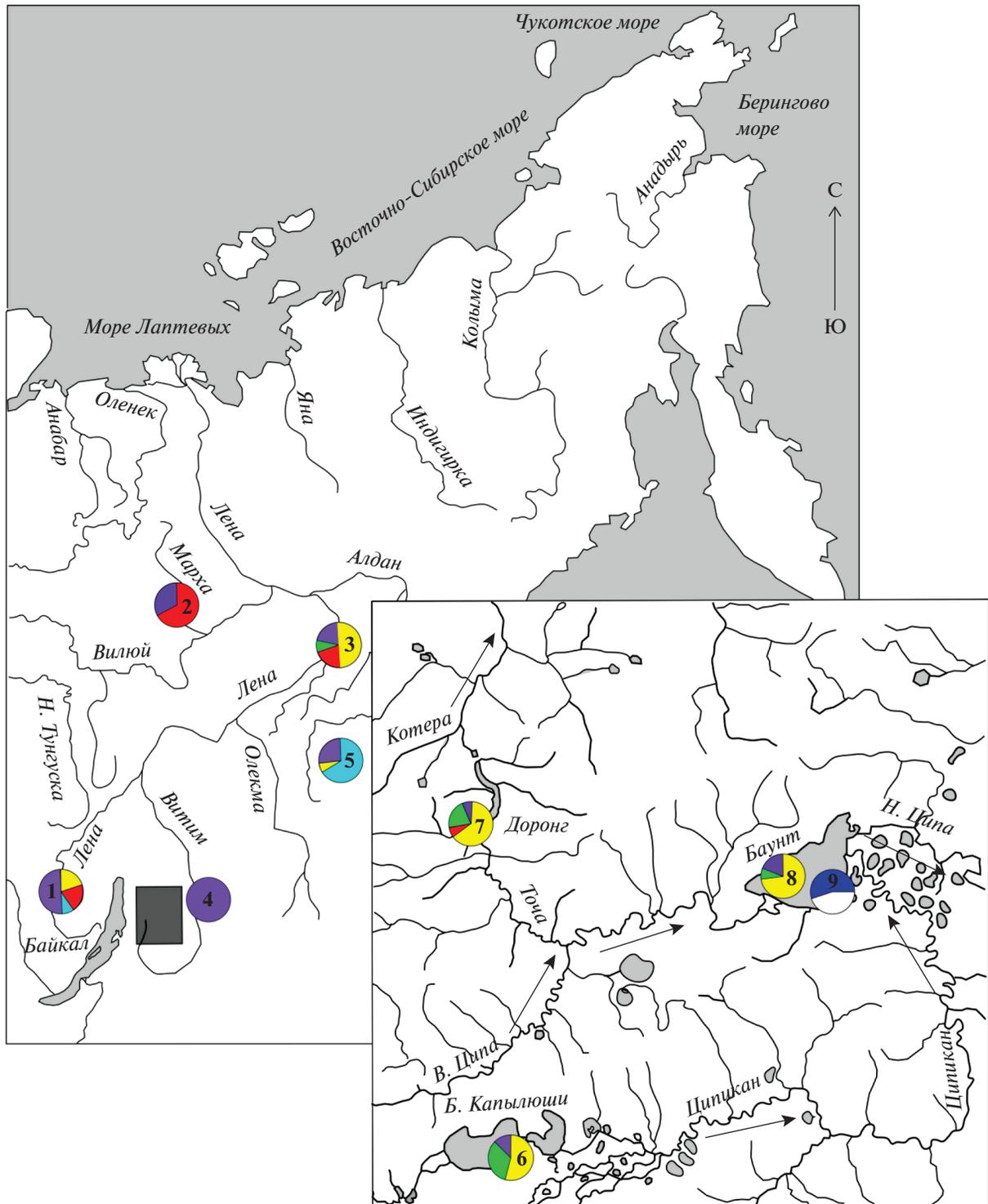


Рис. 6. Географическое распределение гаплотипов сига в бассейне верхнего и среднего течения р. Лены. Выборы как в табл. 1. 9 – распределение гаплотипов ряпушковидного сига.

ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология

Все обитающие в оз. Байкал сиговые рыбы относятся к многочешуйчатым сигам. Все сига Ба-

унтовской системы озер по числу прободенных чешуй в боковой линии относятся к среднечешуйчатым или к многочешуйчатым формам/видам. Пограничное значение этого признака у мелкого ряпушковидного сига возможно связано со слож-

Таблица 6. Тест на нейтральность по *NDI* мтДНК для изученных форм/видов сигов

Выборка	<i>n</i>	Тест Таджимы (<i>D</i>)	<i>p</i>	Тест Фу (<i>FS</i>)	<i>p</i>
1	10	-0.09186	0.49500	-2.51467	0.05800
2	10	-0.12729	0.47700	-1.96882	0.08500
3	9	-0.80442	0.24300	-2.03350	0.05500
4	12	0.61425	0.73500	-0.57666	0.33400
5	11	-1.41744	0.07900	-2.81763	0.02500
6	11	0.17177	0.61200	0.67459	0.06670
7	11	-1.29764	0.08800	-3.14039	0.02500
8	11	0.72706	0.81700	-2.90752	0.05500
9	10	-0.98485	0.18600	-1.54678	0.06500
10	6	-0.68157	0.32300	-2.29890	0.03500
11	3	-	-	-	-
12	4	0.68673	0.76500	-0.61511	0.16400
Для всех	110	-2.02563	0.00400	-25.77617	0.00000

ностью подсчета мелких чешуй, и его настоящая величина несколько занижена. По этому признаку сиги Баунтовских озер отличаются от всех популяций сигов бассейна р. Лены, у которых достоверно меньше чешуй в боковой линии. Сходными с баунтовскими сигами значениями этого признака обладают только сиги Жаровских озер нижнего течения р. Витим и оз. Дальнее (бассейн р. Киренга – верхнее течение р. Лена) [13]. Очевидно, что закономерность в распространении этих форм/видов сигов обусловлена влиянием особых экологических условий и историей форм/видов сигов обитающих в Байкальской рифтовой зоне (БРЗ). Кроме водоемов БРЗ много- и среднечешуйчатые формы сигов в Сибири обитают только в бассейне р. Б. Енисей. Притом, в нижних по течению озе-

рах обитают многотычинковые формы, а в верхних – малотычинковые [26, 62]. Следует иметь в виду, что бассейн р. Енисей связан с БРЗ в течение относительно непродолжительного временного периода [25].

Морфоэкологическую дифференциацию сигов обычно связывают с их трофической специализацией. Согласно нашим исследованиям, малотычинковые сиги во всех озерах питаются хирономидами, крупными донными ракообразными, крупными и воздушными насекомыми, реже встречаются циклопы и остракоды [16]. Ряпушковидный сиг из оз. Баунт является стенофагом и питается исключительно зоопланктоном. Среднетычинковые сиги из озер Доронг и Баунт, в том числе и среднетычинковый сиг из оз. Б. Капылюши, упо-

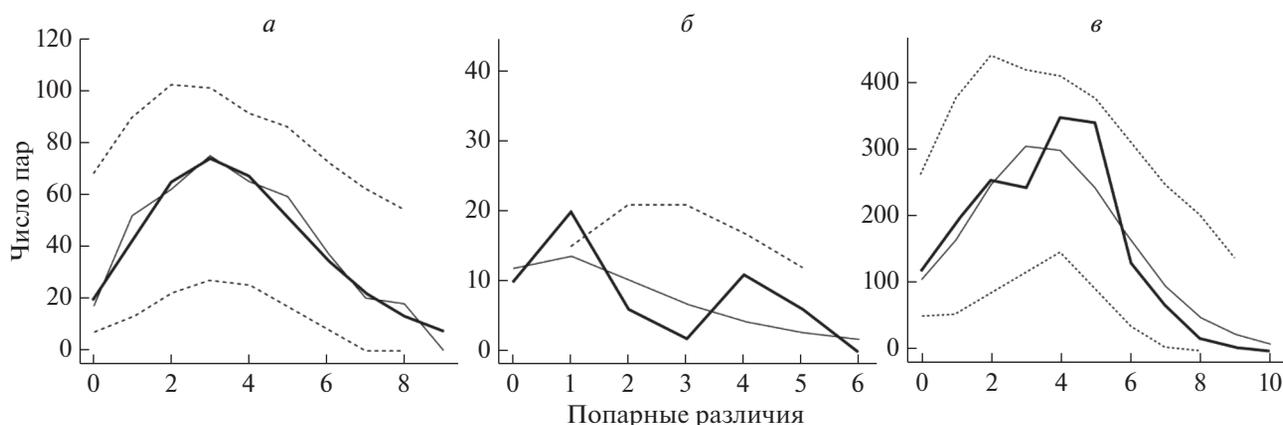


Рис. 7. График распределения числа попарных различий между нуклеотидными последовательностями (*a*) для речных популяций сигов р. Лена с притоками (*b*) для гаплотипов сигов оз. Б. Токо. (*в*) для симпатрических сигов Баунтовской системы озер и р. Витим. Сплошная толстая линия – наблюдаемое распределение, тонкая линия – ожидаемое распределение, пунктирная линия – 95%-ный доверительный интервал.

требляют в пищу весь спектр доступных организмов. Анализ числа жаберных тычинок позволяет утверждать, что во всех трех Баунтовских озерах экологические ниши заняты соответствующими формами/видами сигов. В оз. Баунт обитает доминирующий по численности многотычинковый ряпушковидный сиг, но при этом встречаются и среднетычинковые формы сигов, вероятно, мигрирующие из озер Доронг и Капылюши. По всей видимости, в связи с присутствием в оз. Баунт многотычинкового ряпушковидного сига, доминирующего в этой экологической нише, число среднетычинковых сигов в озере незначительно. Тем не менее, они доминируют в озерах, расположенных выше по течению рек, где ряпушковидный сиг не обнаружен.

MmДНК

Все выборки пыжьяновидных сигов характеризуются высокими показателями генетического полиморфизма (табл. 7), что характерно для давно существующих популяций с высоким эффективным размером, которые при своем становлении, возможно, объединились с популяциями иного происхождения. По всей видимости, некоторые популяции сигов из бассейна р. Лены прошли через “бутылочное горлышко”. В медианной сети гаплотипы сигов из разных локальностей исследованного района сильно перемешаны, и при этом гаплотипы сигов из Баунтовских озер рассредоточены, как минимум, по нескольким звездообразным структурам двух основных гаплогрупп. Это позволяет предполагать, что нынешнее разнообразие сигов Баунтовских озер изначально имеет гибридную природу. Из всех изученных популяций/форм/видов сигов только гаплотипы сига из оз. Б. Токо сформировали отдельную звездообразную структуру, что позволяет предположить высокий уровень изоляции данной популяции и ее относительно недавнее прохождение через “бутылочное горлышко” (рис. 5). Ряпушковидный сиг характеризуется высокими показателями генетического полиморфизма и, в отличие от пыжьяновидных сигов, его гаплотипы сформировали слабо связанную медианную сеть, что указывает на его древнее происхождение. Часть гаплотипов ряпушковидного сига более тесно связана с гаплотипами пыжьяновидных сигов, чем с оригинальными гаплотипами [16, 46]. Этот факт позволяет предположить давнюю гибридизацию ряпушковидного сига с пыжьяновидными сигами местных популяций. Генетическое своеобразие ряпушковидного сига подтверждается также аллозимными данными [46] и дифференциацией последовательностей митохондриального гена цитохрома *b* [18].

Иерархический анализ молекулярной дисперсии AMOVA показал, что большая часть анализируемой генетической изменчивости приходится на

внутрипопуляционную составляющую (72%). Парное сравнение выявило в основном низкие значения F_{ST} между сравниваемыми выборками что позволяет говорить об активном потоке генов между популяциями, который мог быть ограничен расстоянием. В некоторых сравнениях значения индекса достигают более значительных величин. Последнее заключение подтверждается более высокими значениями данного индекса, при сопоставлении максимально удаленных группировок сигов из р. Марха и оз. Б. Токо и выборки сигов из Баунтовской системы озер (табл. 5).

Тесты на нейтральность принимают отрицательные значения в случае экспансивного роста популяции или в случае действия отрицательного отбора. Высокие, достоверные и отрицательные значения теста Фу FS , как правило, свидетельствуют о продолжающейся гибридизации в популяциях и пространственной экспансии. Именно эти процессы отмечаются для популяций сигов из оз. Б. Токо и малотычинковых сигов из оз. Б. Капылюши. При объединении гаплотипов разнотычинковых сигов из оз. Б. Капылюши были получены отрицательные недостоверные значения для обоих индексов. Это может свидетельствовать о разнонаправленных процессах в популяциях сигов даже в пределах одного водоема. Недостоверные значения среднеквадратического отклонения и индекса Харпендинга не позволяют отдать предпочтение той или иной демографической модели.

Происхождение форм среднетычинковых сигов

Существует гипотеза, что в конце одного из последних оледенений в ареал многочешуйчатых сигов пра-баунтовской системы озер, ранее принадлежавших бассейну оз. Байкал, вселились малочешуйчатые пыжьяновидные сики из бассейна р. Лена [12]. Реализация такого события оказалась возможной в связи с изменением направления водостока из “пра-баунтовских” водоемов с байкальского на ленский [63]. Вернее всего, что данное событие произошло одновременно с изменением стока оз. Байкал с ленского (Пра-Манзурский сток) на енисейский [64, 65]. Таким образом, речные малотычинковые и малочешуйчатые сики (р. Лена) проникли через полноводную р. Ципа и распространились далее по рекам Нижняя и Верхняя Ципа, оз. Баунт, р. Тока до оз. Доронг. Озера Б. и М. Капылюши находятся в системе р. Ципикан несколько выше по высоте над уровнем моря, чем оз. Доронг. В период даже максимального подъема воды система этих озер, по всей видимости, лишь нечасто и нестабильно объединялась с системой расположенных ниже над уровнем моря озер Доронг и Баунт. По этой причине автохтонные многочешуйчатые сики в оз. Б. Капылюши подверглись меньшей гибридизации с пыжьяновидными сиками, чем популяции сигов

Таблица 7. Полиморфизм последовательности фрагмента 16S rRNA-tRNA-Leu-NADH1-tRNA-Ile-tRNA-Gln генов мтДНК в популяциях сигов из некоторых водоемов и среднего течения р. Лена

Популяции	Фрагмент ДНК	Длина, пн	<i>n</i>	<i>h</i>	H_d	<i>S</i>	π	<i>K</i>
1. В. Лена, восточносибирский сиг	16S rRNA	735	10	2	0.200	1	0.0003	0.200
	tRNA-Leu	75	10	1	0.000	0	0.0000	0.000
	ND1	975	10	8	0.956	12	0.0043	4.156
	tRNA-Ile	72	10	4	0.711	3	0.0117	0.867
	tRNA-Gln	68	10	3	0.689	2	0.0111	0.822
	Vcero	1929	10	8	0.956	18	0.0031	6.044
2. Р. Марха, восточносибирский сиг	16S rRNA	735	9	2	0.389	1	0.0005	0.389
	tRNA-Leu	75	9	1	0.000	0	0.0000	0.000
	ND1	975	9	6	0.833	7	0.0022	2.111
	tRNA-Ile	72	9	2	0.500	1	0.0068	0.500
	tRNA-Gln	68	9	2	0.500	1	0.0070	0.500
	Vcero	1929	9	5	0.722	8	0.0015	2.889
3. Р. Буотама, восточносибирский сиг	16S rRNA	735	10	1	0.000	0	0.0000	0.000
	tRNA-Leu	75	10	1	0.000	0	0.0000	0.000
	ND1	975	10	7	0.933	9	0.0032	3.089
	tRNA-Ile	72	10	3	0.378	2	0.0056	0.400
	tRNA-Gln	68	10	1	0.000	0	0.0000	0.000
	Vcero	1929	10	7	0.933	11	0.0018	3.489
4. Р. Витим, восточносибирский сиг	16S rRNA	735	12	1	0	0	0.0000	0.000
	tRNA-Leu	75	12	1	0	0	0.0000	0.000
	ND1	975	12	6	0.864	7	0.0027	2.682
	tRNA-Ile	72	12	2	0.167	1	0.0023	0.167
	tRNA-Gln	68	12	1	0.000	0	0.0000	0.000
	Vcero	1929	12	8	0.864	8	0.0015	2.848
5. Оз. Б. Токо, восточносибирский сиг	16S rRNA	735	11	3	0.582	2	0.0011	0.836
	tRNA-Leu	75	11	1	0.000	0	0.0000	0.000
	ND1	975	11	7	0.818	9	0.0021	2.036
	tRNA-Ile	72	11	3	0.345	3	0.0074	0.054
	tRNA-Gln	68	11	2	0.182	1	0.0026	0.182
	Vcero	1929	11	9	0.945	1	0.0016	3.061
6. Оз. Б. Капылюши <i>C. baunti</i>	16S rRNA	735	13	3	0.182	3	0.0006	0.462
	tRNA-Leu	75	13	1	0.000	0	0.0000	0.000
	ND1	975	13	5	0.692	8	0.0028	2.692
	tRNA-Ile	72	13	3	0.295	2	0.0043	0.308
	tRNA-Gln	68	13	2	0.154	1	0.0021	0.154
	Vcero	1929	13	7	0.795	14	0.0019	3.615
7. Оз. Б. Капылюши, малотычинковый сиг	16S rRNA	735	11	3	0.473	4	0.0014	1.018
	tRNA-Leu	75	11	1	0.000	0	0.0000	0.000
	ND1	975	11	8	0.927	12	0.0029	2.872
	tRNA-Ile	72	11	3	0.473	2	0.0071	0.509
	tRNA-Gln	68	11	2	0.182	1	0.0025	0.182
	Vcero	1929	11	9	0.964	19	0.0024	4.582

Таблица 7. Окончание

Популяции	Фрагмент ДНК	Длина, пн	n	h	H_d	S	π	K
8. Оз. Доронг, малотычинковый сиг	16S rRNA	735	6	2	0.533	1	0.00073	0.533
	tRNA-Leu	75	6	1	0.000	0	0.0000	0.000
	ND1	975	6	6	1.000	12	0.00479	4.667
	tRNA-Ile	72	6	1	0.000	0	0.0000	0.000
	tRNA-Gln	68	6	1	0.000	0	0.0000	0.000
	Всего	1929	6	6	1.000	13	0.00271	5.200
9. Оз. Доронг, среднетычинковый сиг	16S rRNA	735	10	1	0.000	0	0.0000	0.000
	tRNA-Leu	75	10	1	0.000	0	0.0000	0.000
	ND1	975	10	5	0.800	5	0.0014	1.333
	tRNA-Ile	72	10	1	0.000	0	0.0000	0.000
	tRNA-Gln	68	10	1	0.000	0	0.0000	0.000
	Всего	1929	10	5	0.800	5	0.0007	1.333
10. Оз. Баунт, ряпушковидный сиг (баунтовская ряпушка)	16S rRNA	735	11	9	0.964	5	0.0048	3.527
	tRNA-Leu	75	11	2	0.182	1	0.0024	0.182
	ND1	975	11	11	1.000	39	0.0158	15.382
	tRNA-Ile	72	11	2	0.436	1	0.00611	0.436
	tRNA-Gln	68	11	1	0.000	0	0.00000	0.000
	Всего	1929	11	11	1.000	52	0.01012	19.527
11. Оз. Баунт, малотычинковый сиг	16S rRNA	735	4	1	0.000	0	0.0000	0.000
	tRNA-Leu	75	4	1	0.000	0	0.0000	0.000
	ND1	975	4	4	0.1000	8	0.00479	4.667
	tRNA-Ile	72	4	1	0.000	0	0.0000	0.000
	tRNA-Gln	68	4	1	0.000	0	0.0000	0.000
	Всего	1929	4	4	0.866	8	0.00242	4.667
12. Оз. Баунт, среднетычинковый сиг	16S rRNA	735	4	1	0.000	0	0.0000	0.000
	tRNA-Leu	75	4	1	0.000	0	0.0000	0.000
	ND1	975	4	4	0.1000	8	0.00479	4.667
	tRNA-Ile	72	4	1	0.000	0	0.0000	0.000
	tRNA-Gln	68	4	1	0.000	0	0.0000	0.000
	Всего	1929	4	4	0.866	8	0.00242	4.667

Примечание. n – число образцов, S – число полиморфных (сегрегирующих) сайтов, h – число гаплотипов, H_d – гаплотипическое разнообразие, π – нуклеотидное разнообразие, K – среднее число нуклеотидных различий (на сайт).

из озер Баунт и Доронг. Сложность проникновения витимских рыб в оз. Капылюши подтверждается отсутствием в нем реофильных видов – ленка и хариуса. Географическое распределение гаплотипов сегов также объясняется недавними постледниковыми событиями, которые отражают относительно небольшой промежуток времени. На такой вывод наталкивает незначительное распространение (в речной системе) части гаплотипов.

Остается открытым вопрос о происхождении всей среднетычинковой группы сегов. До последнего времени доминировала точка зрения, что “букет” форм/видов сформировался по причине

особых экологических и геологических условий этого региона [11–13, 42] и что все обитающие в системе озер формы/виды сегов сформировались там, где они обитают. Полученные нами данные о высокой гаплотипической и нуклеотидной изменчивости мтДНК ряпушковидного сига показывают, что этот морфологически и генетически хорошо дифференцированный вид вряд ли мог длительное время эволюционировать в одном озере Баунт или небольшой системе озер. Вероятно, в прошлом его ареал был значительно шире. Нельзя исключать также, что предок баунтовского ряпушковидного сига также имел отношение к

эволюции пра-ряпушек комплекса *Coregonus sardinella/C. albula*, ранее широко расселенного в Евразии [66]. Возможно, что среднетычинковые сига Баунтовских озер являются результатом интрогрессивной гибридизации автохтонных ряпушковидных сигов-планктонофагов, сформировавшихся после вселения пыжьяновидного сига ленского происхождения в систему оз. Баунт.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Различия исследованных нами популяций сигов из верхнего и среднего течения р. Лены по морфологическим признакам имеет неслучайный характер. Распределение числа жаберных тычинок сигов бассейна р. Лена непосредственно связано с экологией сигов. Так, в озере Б. Токо и в русловой части рек обитают только малотычинковые сига-бентофаги, что вполне отражает наши взгляды на экологию этих форм/видов сигов. Однако в Баунтовской системе озер симпатрично сосуществуют малотычинковые бентофаги, среднетычинковые эврифаги и многотычинковые планктофаги, следов которых не обнаружено в оз. Б. Токо и в многочисленных крупных озерах бассейна р. Б. Енисей [26]. Скорее всего, распределение среднетычинковых форм/видов сигов в водоемах Сибири свидетельствует об их гибридном происхождении, чем о длительной эволюции.

В озерах Доронг и Капылюши доминируют среднетычинковые сига планктофаги, в то время как в оз. Баунт экологическая ниша сигов планктофагов занята доминирующим здесь по численности эндемичным ряпушковидным сигом. По всей видимости, численность среднетычинковых сигов оз. Баунт ограничена реликтовым ряпушковидным сигом, более приспособленным к питанию планктоном.

Существование популяций сигов с разным количеством чешуй в боковой линии, обитающих в бассейнах рек Витим, Лена, Енисей и Амур напрямую связаны с путями расселения сигов в прошлом [65, 67]. По сравнению с бассейном р. Лена, в бассейне р. Енисей более многочисленны многочиселуйчатые и среднечешуйчатые сига, что вероятно обусловлено расселением байкальских многочиселуйчатых сигов через р. Ангара в бассейн р. Енисей (Тоджинскую котловину). Переориентация стока Баунтовских озер с байкальского на ленский позволило ленским малочешуйчатым формам проникать в бассейн р. Ципа и в результате гибридизации число прободенных чешуй в боковой линии у баунтовских сигов снизилось до современного уровня.

Возможно, что наличие нескольких форм весеннерестующих сигов в относительно небольших Баунтовских озерах связано с присутствием в оз. Баунт весеннерестующего ряпушковидного

сига. Результаты генетических анализов показывают, что происхождение последнего имеет более длинную историю, чем время формирования всех ныне живущих байкальских форм/видов сигов [25, 30, 46].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ FSRG-2020-0019 и частичной поддержке грантов РФФИ № 20-04-00610 и (Монг_а) № 20-44-20-54-44017.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Ч. I. М.: Изд-во АН СССР, 1948. 468 с.
2. Правдин И.Ф. Сига водоемов Карело-Финской ССР. М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1954. 324 с.
3. Решетников Ю.С. Экология и систематика сиговых рыб. Москва: Наука, 1980. 300 с.
4. Kottelat M., Freyhof J. Handbook of European Freshwater Fishes. Cornol, Switzerland—Berlin, 2007. 640 p.
5. Богуцкая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2004. 389 с.
6. Черешнев И.А., Волобуев В.В., Шестаков А.В., Фролов С.В. Лососевидные рыбы Северо-Востока России. Владивосток: Дальнаука, 2002. 496 с.
7. Скрябин А.Г. Сиговые рыбы юга Сибири. Новосибирск: Наука, 1979. 230 с.
8. Гундризер А.Н., Иоганзен Б.Г., Кафанова В.В., Кривошеиков Г.М. Рыбы Телецкого озера. Новосибирск: Наука, 1981. 159 с.
9. Голубцов А.С., Малков Н.П. Очерк ихтиофауны Республики Алтай: систематическое разнообразие, распространение и охрана. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2007. 164 с.
10. Скрябин А.Г. Биология байкальских сигов. М.: Наука, 1969. 112 с.
11. Калашиников Ю.Е. Рыбы бассейна реки Витим. Новосибирск: Наука, 1978. 191 с.
12. Карасев Г.Л. Рыбы Забайкалья. Новосибирск: Наука, 1987. 296 с.
13. Скрябин А.Г. Рыбы Баунтовских озер Забайкалья. Новосибирск: Наука, 1977. 232 с.
14. Bernatchez L., Colombani F., Dodson J.J. Phylogenetic relationships among the subfamily Coregoninae as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis // J. Fish Biol. 1991. V. 39. P. 283–290. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.1991>
15. Bernatchez L., Dodson J.J. Allopatric origin of sympatric populations of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*)

- mis) as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis // *Evolution*. 1990. V. 44. № 5. P. 1263–1271. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1990.tb05230.x>
16. *Bochkarev N.A., Zuykova E.I., Abramov S.A. et al.* Morphological, biological and mtDNA sequences variation of coregonid species from the Baunt Lake system (the Vitim River basin) // *Adv. in Limnology*. 2013. V. 64. P. 257–277. <https://doi.org/10.1127/1612-166x2013/0064-0025>
 17. *Politov D.V.* Coregonids of Russia: Evolutionary genetic approach in assessment of current state of biodiversity // *Fundamental and Applied Limnology*. 2017. V. 189. № 3. P. 181–192. <https://doi.org/10.1127/fal/2017/0814>
 18. *Sukhanova L.V., Smirnov V.V., Smirnova-Zalumi N.S. et al.* Molecular phylogeography of Lake Baikal Coregonid Fishes // *Adv. in Limnology*. 2012. V. 63. P. 261–283. <https://doi.org/10.1127/advlim/63/2012/261>
 19. *Sukhanova L.V., Smirnov V.V., Smirnova-Zalumi N.S. et al.* Grouping of Baikal omul *Coregonus autumnalis migratorius* Georgi within the *C. lavaretus* complex confirmed by using a nuclear DNA marker // *Ann. Zool. Fennici*. 2004. V. 41. № 1. P. 41–49.
 20. *Балдина С.Н., Гордон Н.Ю., Политов Д.В.* Генетическая дифференциация муксуна *Coregonus muksun* (Pallas) и родственных видов сиговых рыб (Coregonidae, Salmoniformes) Сибири по мтДНК // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 7. С. 896–905.
 21. *Бодали Р.А., Vuorinen Д.А., Решетников Ю.С., Рист Д.Д.* Генетические связи пяти видов сиговых рыб Сибири // *Вопр. ихтиологии*. 1994. Т. 34. № 2. С. 195–203.
 22. *Бочкарев Н.А., Зуйкова Е.И., Политов Д.В.* Видовая и популяционная структура сигов р. *Coregonus* из Баунтовской системы озер (бассейн р. Витим) // *Биология, биотехника разведения и состояние запасов сиговых рыб*. Тюмень: Госрыбцентр, 2013. С. 26–32.
 23. *Renaut S., Nolte A.W., Bernatchez L.* Mining transcriptome sequences towards identifying adaptive single nucleotide polymorphisms in lake whitefish species pairs (*Coregonus* spp. Salmonidae) // *Mol. Ecol.* 2010. V. 19. P. 115–131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04477.x>
 24. *Исаченко В.Л.* Новый вид сига из бассейна р. Енисей // *Тр. Сиб. ихтиол. лаборатории*. 1925. Т. 2. № 1. С. 3–18.
 25. *Смирнов В.В., Смирнова-Залуми Н.С., Суханова Л.С.* Микроэволюция байкальского омуля *Coregonus autumnalis migratorius* (Georgi). Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. 246 с.
 26. *Bochkarev N.A., Zuykova E.I., Katokhin A.V.* Morphology and mitochondrial DNA variation of the Siberian whitefish *Coregonus lavaretus pidschian* (Gmelin) in the upstream water bodies of the Ob and Yenisei rivers // *Evol. Ecol.* 2011. V. 25. P. 557–572. <https://doi.org/10.1007/s10682-010-9437-7>
 27. *Кагановский А.Г.* Промысловые рыбы реки Анадырь и Анадырского лимана // *Вестн. Дальневосточного филиала АН СССР*. 1933. № 1/2. С. 137–139.
 28. *Решетников Ю.С., Слугин И.В., Мамонтова Т.Г.* О симпатрических популяциях сига реки Анадырь // *Изменчивость рыб пресноводных экосистем*. М.: Наука, 1979. С. 113–136.
 29. *Baldina S.N., Gordon N.Y., Politov D.V.* Genetic relationships of the Ussuri cisco, *Coregonus ussuriensis* Berg 1906, in view of mtDNA data // *Adv. in Limnology*. 2007. V. 60. P. 83–89.
 30. *Бочкарёв Н.А., Зуйкова Е.И., Политов Д.В.* Таксономический статус и происхождение некоторых экологических форм сигов вида *Coregonus lavaretus* (L.) из водоемов Сибири // *Генетика*. 2017. Т. 53. № 8. С. 922–932 <https://doi.org/10.1134/S0016675818090047>
 31. *Бочкарев Н.А., Сендек Д.С., Зуйкова Е.И. и др.* Популяционная структура и происхождение некоторых экологических форм *Coregonus lavaretus pidschian* из р. Оленёк // *Генетика*. 2021. Т. 57. № 7. С. 797–809. <https://doi.org/10.31857/S0016675821070043>
 32. *Сендек Д.С., Иванов Е.В.* О причинах генетической неоднородности сига-пыжьяна *Coregonus lavaretus pidschian* реки Анабар // *Экол. генетика*. 2017. Т. 15. № 1. С. 20–26. <https://doi.org/10.17876/ecogen15320-26>
 33. *Hudson A.G., Vonlanthen P., Seehausen O.* Rapid parallel adaptive radiations from a single hybridogenic ancestral population // *Proc. of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2011. 278/1702. P. 58–66. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0925>
 34. *Vonlanthen P., Roy D., Hudson A.G. et al.* Divergence along a steep ecological gradient in lake whitefish (*Coregonus* sp.) // *J. Evol. Biol.* 2009. V. 22. № 3. P. 498–514. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01670.x>
 35. *Ilmast N., Sendek D., Zuykova E. et al.* Morphological and genetic variability of the mass whitefish forms in Lake Onega // *KnE Life Sciences*. 2020. V. 5. № 1. P. 141–151. <https://doi.org/10.18502/kl.v5i1.6037>
 36. *Kahilainen K.* Ecology of Sympatric Whitefish (*Coregonus lavaretus* (L.)) Forms in a Subarctic Lake. Helsinki: Edita Prima, 2004. 44 p.
 37. *Ильмаст Н.В., Сендек Д.С., Тутов С.Ф. и др.* К вопросу о дифференциации экологических форм/подвидов сига *Coregonus lavaretus* озера Каменного // *Уч. зап. Петрозаводск. гос. ун-та*. 2016. № 4(157). С. 42–53.
 38. *Ostbye K., Amundsen P.A., Bernatchez L. et al.* Parallel evolution of ecomorphological traits in the European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) species complex during postglacial times // *Mol. Ecol.* 2006. V. 15. № 13. P. 3983–4001. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03062.x>
 39. *Winkler K.A., Paminger-Lahnsteiner B., Wanzenböck J., Weiss S.* Hybridization and restricted gene flow be-

- tween native and introduced stocks of Alpine whitefish (*Coregonus* sp.) across multiple environments // Mol. Ecol. 2011. V. 20. № 3. P. 456–472.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04961.x>
40. *Politov D.V., Bickham J.W., Patton J.C.* Molecular phylogeography of Palearctic and Nearctic ciscoes // Ann. Zool. Fennici. 2004. V. 41. № 1. P. 13–23.
41. *Politov D.V., Gordon N.Y., Makhrov A.A.* Genetic identification and taxonomic relationships of six Siberian *Coregonus* species // Biol. and Management of Coregonid Fishes, Archiv fuer Hydrobiologie Special Issues – Advances in Limnology. 2002. V. 57. P. 21–34.
42. *Калашиников Ю.Е.* Многотычинковые сиги озера Орон системы р. Витим // Вопр. ихтиологии. 1968. Т. 8. № 4(51). С. 637–645.
43. *Анпилова В.И.* О систематическом положении баунтовской ряпушки (р. Витим) // Докл. АН СССР. 1956. Т. 111. № 4. С. 898–900.
44. *Мухомедияров Ф.Б.* Ряпушка – *Coregonus sardinella baunti* subsp. *nova* из системы Ципа-Ципиканских озер бассейна реки Витим // Докл. на 1-й науч. сессии Якутской базы АН СССР. Якутск: 1948. С. 270–280.
45. *Пронин Н.М., Бурдуковская Т.Г., Батуева М.Д. и др.* Паразитофауна сиговых рыб рода *Coregonus* из водоемов Ципо-Ципиканской системы (Забайкалье) // Вопр. ихтиологии. 2015. Т. 55. № 5. С. 739–746
<https://doi.org/10.7868/S0042875215040141>
46. *Baldina S.N., Gordon N.Y., Bochkarev N.A., Politov D.V.* Genetic differentiation among sympatric whitefishes and ciscoes from Transbaikal Lake Baunt by mtDNA and allozyme loci // Proc. 12th Int. Symp. on the Biol. and Management of Coregonid Fishes (25–29 August 2014, Listvianka, Russia). Listvyanka–Irkutsk: 2014. P. 38–39.
47. *Мамонтов А.М.* Ледниковые периоды и формообразования у реликтовых сиговых рыб в водоемах юга Сибири // Вопр. ресурсоведения, ресурсопользования, экологии и охраны. Ч. 5. Якутск: Якутский гос. ун-тет, 2000. С. 127–146.
48. *Кириллов Ф.Н.* Рыбы Якутии. М.: Наука, 1972. 359 с.
49. *Бочкарёв Н.А., Зуйкова Е.И.* Дополнительные возможности сбора морфологических данных у рыб // Мат. Всерос. конф. “Биол. аспекты рационального использования и охраны водоемов Сибири” (Томск, 2007). Томск: Лито–Принт, 2007. С. 304.
50. *Бочкарев Н.А., Зуйкова Е.И., Политов Д.В.* Дополнительные возможности сбора и регистрации морфологических данных у рыб // Биология, биотехника разведения и состояния запасов сиговых рыб. Тюмень: Госрыбцентр, 2013. С. 32–36.
51. *Darroch J.N., Mosimann J.E.* Canonical and principal components of shape // Biometrika. 1985. V. 72. № 2. P. 241–252.
52. *Mosimann J.E.* Size allometry: size and shape variables with characteristics of the log normal and generalized gamma distributions // J. Am. Stat. Association. 1970. V. 65. P. 930–945.
53. *Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D.* PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // Palaeontologia Electronica. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9.
54. *Politov D.V., Gordon N.Y., Afanasiev K.I. et al.* Identification of Palearctic coregonid fish species using mtDNA and allozyme genetic markers // J. Fish Biol. 2000. V. 57. Suppl. A. P. 51–71.
55. *Librado P., Rozas J.* DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1451–1452.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
56. *Excoffier L., Lischer H.E.L.* Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Res. 2010. V. 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
57. *Fu Y.-X., Li W.-H.* Statistical tests of neutrality of mutations // Genetics. 1993. V. 133. P. 693–709.
58. *Tajima F.* Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // Genetics. 1989. V. 123. № 3. P. 585–595.
59. *Excoffier L., Laval G., Schneider S.* Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinformatics Online. 2005. V. 5. № 1. P. 47–50.
60. *Rogers A.R., Harpending H.* Population growth makes waves in the distribution of pair-wise genetic differences // Mol. Biol. Evolution. 1992. V. 9. № 3. P. 552–569.
61. *Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
62. *Гундризер А.Н.* Рыбы Тувинской АССР: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Томск: Томский гос. ун-т, 1975. 48 с.
63. *Кожов М.М.* Пресные воды Восточной Сибири. Иркутск: 1950. 368 с.
64. *Кононов Е.Е., Мац В.Д.* История формирования стока вод Байкала // Изв. вузов. Геол. и разведка. 1986. № 6(32) С. 91–98.
65. *Мац В.Д., Щербаков Д.Ю., Ефимова И.М.* Поздне-меловая кайнозойская история Байкальской впадины и формирование уникального биоразнообразия Байкала // Стратиграфия. Геол. корреляция. 2011. Т. 19. № 1. С. 40–61.
66. *Sendek D.S.* Phylogenetic relationships in vendace and least cisco, and their distribution areas in western Eurasia // Ann. Zool. Fennici. 2021. V. 58. P. 289–306.
67. *Еникеев Ф.И.* Палеогеография Сарганского оледенения горного обрамления Муйской впадины (Северное Забайкалье) // Горные исследования. 2018. № 3. С. 58–70.
<https://doi.org/10.17223/25421379/8/6>

Morphological, Ecological and Genetic Variability Diversity of Whitefish *Coregonus lavaretus sensu lato* from Upper and Middle Stream of Lena River

N. A. Bochkarev^{a, *}, D. S. Sendek^b, A. V. Katokhin^c, E. I. Zuykova^a,
A. N. Matveev^d, L. A. Pestryakova^e, E. S. Zakharov^e,
В. П. Самусенок^b, А. Л. Юрьев^b, and D. V. Politov^f

^aFederal Research Center, Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630091 Russia

^bState Research Institute of Lake and River Fishery, Saint Petersburg, 199053 Russia

^cInstitute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^dIrkutsk State University, Irkutsk, 664003 Russia

^eAmmosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, 677980 Russia

^fVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: nikson_1960@mail.ru

The results of morphogenetic analysis of whitefish populations from the upper and middle stream of the Lena River and sympatric forms/species from the Baunt Lake system are presented. It has been shown that seven forms/species with a high level of differentiation inhabit the lakes. In Lake Dorong and Lake Bolshie Kaplyushi sympatric whitefish forms were characterized by the similar number of gill rakers, but different lateral line counts. In Lake Baunt, located downstream, all forms/species of whitefishes inhabiting the upstream lakes are present, as well as an endemic *cisco*-like densely-rakered whitefish. The analysis of variability of the *ND1* gene of the mtDNA with whitefish populations from a middle stream of the Lena River showed that whitefish haplotypes from the Baunt Lake system are heavily intermixed and carry several distinct phylogenetic lineages. The *cisco*-like whitefish is of more ancient origin compared to other whitefish forms/species.

Keywords: sympatric speciation, whitefish, mtDNA, haplotypes, Siberia, Lena River, Vitim River, Baunt Lake system.

ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ БАЙКАЛЬСКИХ
СИГОВЫХ РЫБ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ© 2022 г. Т. В. Сидорова¹ *, В. В. Смирнов², С. В. Кирильчик¹, Л. В. Суханова¹¹Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия²Байкальский музей Иркутского научного центра Сибирского отделения
Российской академии наук, пос. Листвянка, 664520 Россия*e-mail: tyana_be@mail.ru

Поступила в редакцию 19.05.2022 г.

После доработки 29.06.2022 г.

Принята к публикации 30.06.2022 г.

С использованием пяти микросателлитных локусов, Bwf1, Bom22b, Cocl23, Cam1, Cam5, изучен полиморфизм девяти популяций байкальского комплекса сиговых рыб, представленного в озере тремя видами: омулем и двумя сигадами, озерным и озерно-речным. Обобщенная выборка составила 244 особи. Популяции омуля и озерного сига кластеризуются в две отдельные группы с небольшими парными генетическими расстояниями. Расстояния между группами невелики, на основании чего можно заключить, что байкальские сиг и омуль дивергировали друг от друга в недавнем геологическом прошлом. На большом расстоянии от этих групп находится популяция омуля из оз. Кулинда (бассейн р. Кичера, северного притока оз. Байкал), что подтверждает ее изолированность от всего комплекса омуль/озерный сиг. Промежуточное положение популяции омуля, нерестящейся в еще одном северном притоке озера, р. Верхняя Ангара, между остальными байкальскими популяциями омуля и кулиндинским омулем свидетельствует о наличии потока генов из оз. Кулинда в северные притоки озера. Также на большом расстоянии находится нерестящийся в р. Верхняя Ангара озерно-речной сиг, несмотря на наложение сроков и мест нереста с верхнеангарским омулем. Выявленный рисунок генетического полиморфизма свидетельствует о недавней симпатрической дивергенции байкальских омуля, озерного сига и их популяций, подтверждает факт географической изоляции одной из популяций байкальского омуля в оз. Кулинда ледниково-тектонического происхождения и не противоречит гипотезе о продолжительной аллопатрической дивергенции предка байкальского озерно-речного сига за пределами озера.

Ключевые слова: Байкал, сиговые рыбы, эволюция, микросателлиты, дивергенция.

DOI: 10.31857/S001667582211011X

Изучение популяционного полиморфизма видов, имеющих промысловое значение и большой ареал обитания, является актуальной задачей популяционной экологии. Для изучения микроэволюционных процессов [1], генетической структуры популяций, а также взаимодействий между ними [2, 3] широко используются микросателлитные локусы благодаря высокому уровню полиморфизма аллелей и гетерозиготности, большой представленности в геноме, как в некодирующих участках, так и в составе регуляторных последовательностей [4].

Объект данного исследования – популяции сиговых рыб Байкала: байкальский омуль и два сига, озерный и озерно-речной, освоившие практически все реки и заливы, а в открытом озере – глубины до 400 м (рис. 1, табл. 1). Популяционная структура отдельных видов байкальских сиговых

изучалась изоферментным анализом [5–9] и рестрикционным анализом мтДНК [10–12]. Однако совместного анализа видов одним методом до сих пор не проводилось. В настоящей работе впервые для исследования процессов внутриозерной эволюции использованы микросателлитные локусы и осуществлен единовременный сравнительный анализ популяционного полиморфизма всех трех видов байкальских сиговых. В контексте полученных данных обсуждается спорный таксономический статус байкальских видов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования и характеристики локусов

Объектом исследования явились девять выборок из девяти популяций байкальских сиговых

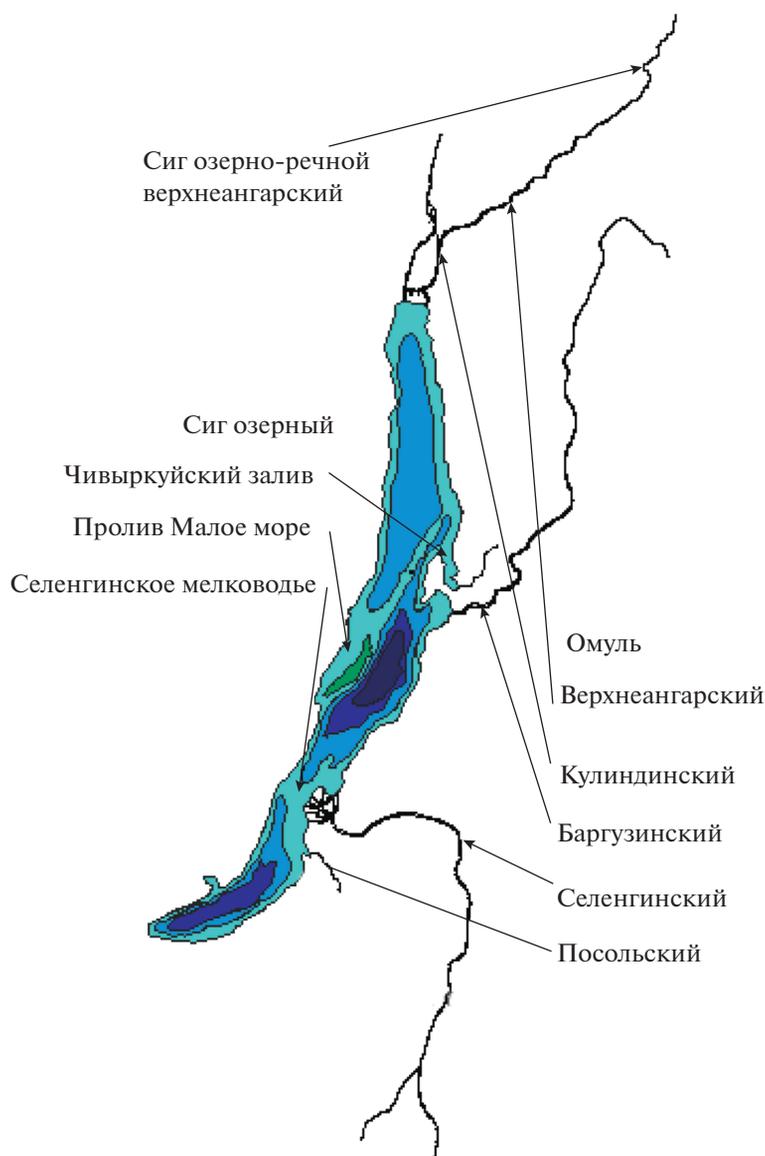


Рис. 1. Карта сбора материала.

рыб (рис. 1, табл. 1). В микросателлитный анализ включены:

- четыре популяции пелагиобионта байкальского омуля, размножающегося в притоках озера, и представляющие три, выделяемые ихтиологами, морфо-экологические группы [13];

- популяция омуля оз. Кулинда – географический изолят байкальского омуля периода олигоцен [14, 15];

- три популяции озерного сига, нерест которого проходит непосредственно в озере, его мелководных участках;

- одна популяция озерно-речного сига, мигрирующего на нерест в крупные притоки озера.

Ткани (мышцы, плавники, печень) отбирались у половозрелых рыб в период нереста на путях миграций. Общее число рыб составило 244 особи.

Выделение ДНК

Суммарная ДНК выделялась экстракцией фенолом и хлороформом [16] из фиксированных в 95%-ном этаноле тканей (мышцы, плавники, печень).

ПЦР

Микросателлитные локусы амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя праймеры, характеристика которых

Таблица 1. Места сбора проб и объем проанализированного материала

Вид	Номер выборки	Популяция/МЭГ* (место размножения)	Число образцов
Байкальский омуль **/**Coregonus migratorius Georgi, 1775	1	Баргузинский омуль/прибрежная МЭГ (р. Баргузин)	44
	2	Посольский омуль/придонно-глубоководная МЭГ (Посольский сор, р. Большая)	32
	3	Селенгинский омуль/пелагическая МЭГ (р. Селенга)	29
	5	Кулиндинский омуль, географический изолят байкальского омуля (оз. Кулинда)	37
	4	Верхнеангарский омуль/прибрежная МЭГ (р. Верхняя Ангара)	12
Байкальский озерный сиг **/**Coregonus baicalensis Dybowski, 1874	6	Селенгинский сиг (Селенгинское мелководье)	39
	7	Чивыркуйский сиг (Чивыркуйский залив)	10
	8	Маломорский сиг (пролив Малое Море)	22
Байкальский озерно-речной сиг **Coregonus pidschian (Gmelin, 1789) ***Coregonus fluviatilis Isachenko, 1925	9	Верхнеангарский озерно-речной сиг (р. Верхняя Ангара)	19

* – морфо-экологическая группа (МЭГ) омуля, размножающегося в притоках оз. Байкал; ** – согласно электронной базе данных FishBase www.fishbase.org/; *** – согласно электронному каталогу рыб Эшмейера: www.calacademy.org.

Таблица 2. Характеристики микросателлитных локусов

Локус	Элемент повтора	$t_{отжига}$, °C	Последовательность праймеров
Bwf1 [17]	(GA) ₁₆ N ₉₅ (TG) ₁₃	60	L: TACAGAGAAATACACACAACGCATCAA R: GAGAGGTTCCATTACTGAGCAC
22b [18]	(CT) ₁₅	60	L: GCTGTATGAGGATAGCATTC R: GCATTAGGTCGTTTTGTGT
Coc123 [19]	(GT) ₈	60	L: GCCATGGATGCCTTCTTGAT R: GGCCTTAACTTGACACGGTCTG
Cam1 [18]	(GT) ₃ C(GT) ₃ A(GT) ₆ N ₉ (CA) ₆ N ₁₉ (GT) ₁₁	65	L: GGCTGGTGTGAACAAAAACA R: CCACGTACAGGGAGGCTACA
Cam5 [18]	(GT) ₁₆	58	L: CGGTCATGGACAAGGTTATTC R: GGGTTCACATCAAGGCACT

дана в табл. 2. ПЦР проводилась в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг ДНК, 1 мкМ каждого праймера, 10 мМ Трис-НСl, рН 8.9, 40 мМ КCl, 5 мМ MgCl₂ и 1 е.а. *Taq*-полимеразы при следующих условиях: 3 мин при 95°C, последующие 30 циклов (30 с при 94°C, 30 с при локус-специфичной температуре отжига (см. в табл. 2) и 30 с

при 72°C) и 10 мин при 72°C. При амплификации локуса Cam1 оптимальное количество ПЦР-продукта получали, увеличивая число циклов амплификации до 40. При увеличении числа циклов более качественный продукт получался при использовании *Taq*-полимеразы, свободной от ДНК. Реакция в данном случае проводилась в буфере,

Таблица 3. Результаты обработки данных полиморфизма пяти микросателлитных локусов в программе Micro-checker

Локус	Омуль					Озерный сиг			Озерно-речной сиг
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bwf1	+	+	–	+	–	+	–	+	+
Bom22b	–	+	–	+	–	+	–	+	–
Coc123	–	–	+	–	–	–	–	–	–
Cam1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Cam5	–	–	+	–	–	–	–	–	–

Примечание. 1–9 – номера выборок (для табл. 3, 5, 6): 1 – баргузинский омуль, 2 – посольский омуль, 3 – селенгинский омуль, 4 – верхнеангарский омуль, 5 – кулиндинский омуль, 6 – селенгинский сиг, 7 – чивыркуйский сиг, 8 – маломорский сиг, 9 – верхнеангарский озерно-речной сиг. Знаком (+) и (–) обозначено наличие и отсутствие нулевых аллелей.

содержащем 16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 65 мМ Трис-НСl, pH 8.8 и 0.01% Tween 20.

Электрофорез

Продукты ПЦР разделялись с помощью вертикального электрофореза в 6%-ном денатурирующем полиакриламидном геле [20]. Использовали раствор 6%-ного полиакриламида в буфере TBE: 0.05 М Трис-НСl и 0.02 М EDTA, pH 8.0. Визуализация полос осуществлялась методом окрашивания нитратом серебра и радиографическим методом с применением в качестве метки радиоактивного изотопа ^{32}P . Для определения размеров микросателлитных фрагментов использовался маркер молекулярной массы с шагом 25 пн (Promega, США).

Включение радиоактивной метки (кинирование)

Мечение 5'-концов праймеров проводили с помощью реакции кинирования. Реакционная смесь для кинирования содержала буфер Mg-DTT, буфер Трис-НСl, 10 пМ праймеров, T4 полинуклеотидкиназу, аденозин-5'-[γ - ^{32}P] трифосфат и воду. Меченые праймеры использовали в реакции ПЦР. После электрофоретического разделения продуктов реакции ПЦР полиакриламидный гель закладывали с рентгеновской пленкой для получения радиоавтографа. Затем проводился анализ длин фрагментов по снимку.

Фиксация серебром

После электрофореза гель переносили в пластиковую емкость и подвергали последующей обработке, включающей несколько этапов:

1. Гель выдерживали при перемешивании 15 мин в фиксирующем растворе 0.1% СТАВ.

2. Промывали три раза 0.3%-ным гидроксидом аммония.

3. Выдерживали при перемешивании 15–20 мин в серебряном растворе, содержащем 0.1% нитрата серебра, 4 мМ гидроксида натрия и 0.4% гидроксида аммония.

4. Проявляли изображение на свету в трех сменах проявителя (раствор 0.1%-ного параформа и 2%-ного карбоната натрия).

Затем проводился анализ длин фрагментов по снимку.

Статистическая обработка данных

При помощи программы Micro-checker [21] данные были протестированы на наличие “нулевых” аллелей, “доминирования коротких аллелей” и “заикания”. По результатам обработки данных в программе Micro-checker наличие “нулевых” аллелей на основании дефицита гетерозигот по методу Brookfield [22] с вероятностью более 95% было предсказано для локусов Bwf1 и 22b для популяций посольского и верхнеангарского омулей, а также селенгинского и маломорского сегов; только для локуса Bwf1 для популяций баргузинского омуля и верхнеангарского озерно-речного сига; для локусов Coc123 и Cam5 для популяций селенгинского омуля (табл. 3). Для популяций кулиндинского омуля и чивыркуйского сига не было найдено ни одного “нулевого” аллеля. Однако при коррекции входных данных на основе оценок частот нулевых аллелей [23] резко возрастало количество отсутствующих данных (missing data) и, как следствие, значительно сокращалось число анализируемых локусов. Со-

ответственно дальнейший анализ вели без коррекции, а информацию о наличии “нулевых” аллелей использовали для интерпретации значений соответствия частот аллелей в исследованных выборках равновесию Харди–Вайнберга.

В программе Arlequin v3.5 [24] по пяти локусам (Bwf1, Cocl23, Bom22b, Cam1, Cam5) было проведено вычисление наблюдаемой (H_O) и ожидаемой (H_E) гетерозиготности, отклонения от равновесия Харди–Вайнберга, количества аллелей на локус, аллельного разнообразия, среднего индекса аллельных “потерь” Garza–Williams (G–W-индекс) на локус, а также был вычислен критерий F_{ST} [25, 26] как показатель меры генетической дифференциации. Значения F_{ST} и метод объединения ближайших соседей (NJ), реализованные в программах Arlequin [24] и MEGA7.0 [27], использовались для построения схемы, отражающей степень репродуктивной обособленности между анализируемыми популяциями. Для построения дерева гаплотипов, основанного на данных полиморфизма микросателлитных локусов, использовались генетические расстояния Da [28] и метод объединения ближайших соседей (NJ – Neighbor-Joining), реализованные в программе Population v1.2.32 [29]. При построении схем визуализацию осуществляли в программе FigTree v1.4.4 [30].

Для выявления границ популяций и их числа была использована программа STRUCTURE [31]. В основе программы лежит алгоритм Монте-Карло по схеме марковских цепей (MCMC) для байесовской статистики, при помощи которого можно определить популяционную структуру, опираясь на наиболее вероятное разделение данных на кластеры. В программе STRUCTURE при анализе микросателлитных данных предполагается, что популяции находятся в равновесии Харди–Вайнберга и равновесны по сцеплению. Параметры настраивались на основании статей, посвященных анализу популяций с неравными выборками, а также подбору надежных значений, обеспечивающих достоверность полученных данных [32, 33], и приведены в табл. 4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетическое разнообразие

Проведенный анализ выявил высокий полиморфизм изученных популяций байкальских сиговых по исследованным локусам (табл. 5). Наименьшее число выявленных аллелей на локус в анализируемой выборке составило два (22b и Cocl23), а наибольшее – 26 (рис. 2). В целом по всем выборкам среднее число аллелей на локус составило восемь. Популяции байкальского омуля по числу выявленных аллелей и уровню гетерозиготности в целом оказались более полиморфными (среднее число аллелей – 10.9, средний уровень $H_E = 0.77$,

Таблица 4. Настройки параметров для запусков программы STRUCTURE для разных K

K	Burnin	Alpha
2	10000	0.5
3	10000	0.3
4	10000	0.25
5	300000	0.2
6	500000	0.16
7	500000	0.14
8	500000	0.12
9	500000	0.11
10	500000	0.1

$H_O = 0.70$) чем популяции озерного сига (среднее число аллелей – 6.4, средний уровень $H_E = 0.6404$, $H_O = 0.60$). Еще более низкий уровень полиморфизма показали малочисленные популяции – географический изолят байкальского омуля – омуль оз. Кулинда (среднее число аллелей – 5.6, средний уровень $H_E = 0.58$, $H_O = 0.60$) и верхнеангарская популяция озерно-речного сига (среднее число аллелей – 4.4, средний уровень $H_E = 0.51$, $H_O = 0.47$).

G–W-индекс для всех исследованных выборок оказался существенно менее 0.70, что предполагает прохождение популяций через “бутылочное горлышко” [34].

Генетическая дифференциация и популяционная структура

Согласно полученным значениям F_{ST} (табл. 6) все проанализированные выборки достоверно отличались друг от друга, за исключением селенгинского озерного сига, который не демонстрировал достоверных различий от двух других выборок озерных сигов (чивыркуйского и маломорского). Если руководствоваться интерпретацией значений F_{ST} , предложенной Райтом [35], очень большая дифференциация выявлена между популяциями кулиндинского омуля и верхнеангарского озерного сига ($F_{ST} = 0.306$), которые, в свою очередь, умеренно дифференцированы от четырех популяций омуля и трех популяций озерных сигов ($F_{ST} = 0.135–0.217$). Парные значения F_{ST} между популяциями омуля (исключая омуля оз. Кулинда) и популяциями озерного сига располагаются на предложенной шкале ниже умеренных, но выше незначительных показателей ($F_{ST} = 0.062–0.127$); разброс значений F_{ST} между популяциями омуля смещается в сторону незначительных показателей ($F_{ST} = 0.03–0.1$); различия между озерными сигадами либо недостоверны, либо незначительны

Таблица 5. Генетическая характеристика выборок из популяций байкальских ситовых по микросателлитным локусам

Локус	Характеристика выборки	Омуль									Озерный сиг				Озеро-речной сиг
		1	2	3	4	5	6	7	8	9					
Vwf1	<i>n</i>	44	32	28	13	36	38	10	21	19					
	A	26*	22*	15	14*	8	19*	7	15*	6*					
	<i>p</i>	0.000	0.007	0.577	0.000	0.301	0.000	0.590	0.007	0.000					
	H_O	0.636	0.813	0.857	0.615	0.556	0.737	0.800	0.762	0.316					
	H_E	0.946	0.929	0.899	0.638	0.579	0.940	0.815	0.919	0.744					
Vom22b	<i>n</i>	43	30	28	14	37	38	10	21	19					
	A	11	6*	8	8*	6	8*	4	6*	2					
	<i>p</i>	0.006	0.000	0.005	0.000	0.006	0.000	0.778	0.000	0.607					
	H_O	0.674	0.233	<u>0.857</u>	0.428	<u>0.649</u>	0.472	0.700	0.381	0.526					
	H_E	0.759	0.453	<u>0.710</u>	0.865	<u>0.631</u>	0.784	0.558	0.786	0.443					
Coc123	<i>n</i>	43	31	28	15	36	38	10	21	19					
	A	6	7	8*	6	2	3	3	4	4					
	<i>p</i>	0.009	0.012	0.088	0.470	0.197	0.690	0.738	0.224	1.000					
	H_O	0.651	0.581	0.535	1.000	0.389	0.500	0.500	0.714	0.158					
	H_E	0.747	0.673	0.718	0.763	0.501	0.568	0.573	0.598	0.154					
Sam1	<i>n</i>	44	29	27	15	36	38	10	22	18					
	A	6	3	9	4	3	3	3	3	3					
	<i>p</i>	0.001	0.003	0.000	0.005	0.836	0.210	0.046	1.000	0.113					
	H_O	<u>0.841</u>	0.517	0.629	<u>1.000</u>	0.444	0.447	<u>0.900</u>	0.591	0.444					
	H_E	<u>0.619</u>	0.618	0.753	<u>0.689</u>	0.402	0.591	<u>0.574</u>	0.574	0.446					
Sam5	<i>n</i>	43	29	28	15	37	38	10	22	19					
	A	11	15	20*	13	9	7	4	7	7					
	<i>p</i>	0.641	0.042	0.005	0.475	0.002	0.489	1.000	0.642	0.787					
	H_O	0.814	0.862	0.667	0.933	<u>0.973</u>	0.474	0.400	0.591	0.895					
	H_E	0.857	0.909	0.939	0.912	<u>0.780</u>	0.444	0.363	0.573	0.763					
Средняя по пяти локусам	H_O	0.723	0.601	0.709	0.796	0.602	0.526	0.660	0.608	0.468					
	\pm s.d.	0.096	0.253	0.142	0.260	0.230	0.119	<u>0.207</u>	0.148	0.276					
	H_E	0.786	0.716	0.804	0.834	0.579	0.667	<u>0.577</u>	0.690	0.510					
	\pm s.d.	0.123	0.202	0.107	0.105	0.142	0.197	<u>0.161</u>	0.156	0.252					
	Средняя по пяти локусам	G-W	0.456	0.455	0.4249	0.393	0.444	0.429	0.4077	0.409	0.445				
	\pm s.d.	0.096	0.109	0.042	0.137	0.191	0.170	0.209	0.163	0.132					

Примечание. *n* – число исследованных экземпляров; A – число аллелей (* обозначено наличие нулевых аллелей); *p* – вероятность соответствия генотипических распределений равновесию Харди–Вайнберга (**жирным** шрифтом отмечены статистически достоверные результаты при $P < 0.05$). Значения H_O и H_E подчеркнуты в случае, когда $H_O > H_E$ при $P < 0.05$. G–W-индекс – средний индекс аллельных “потерь” Garza–Williams на локус.

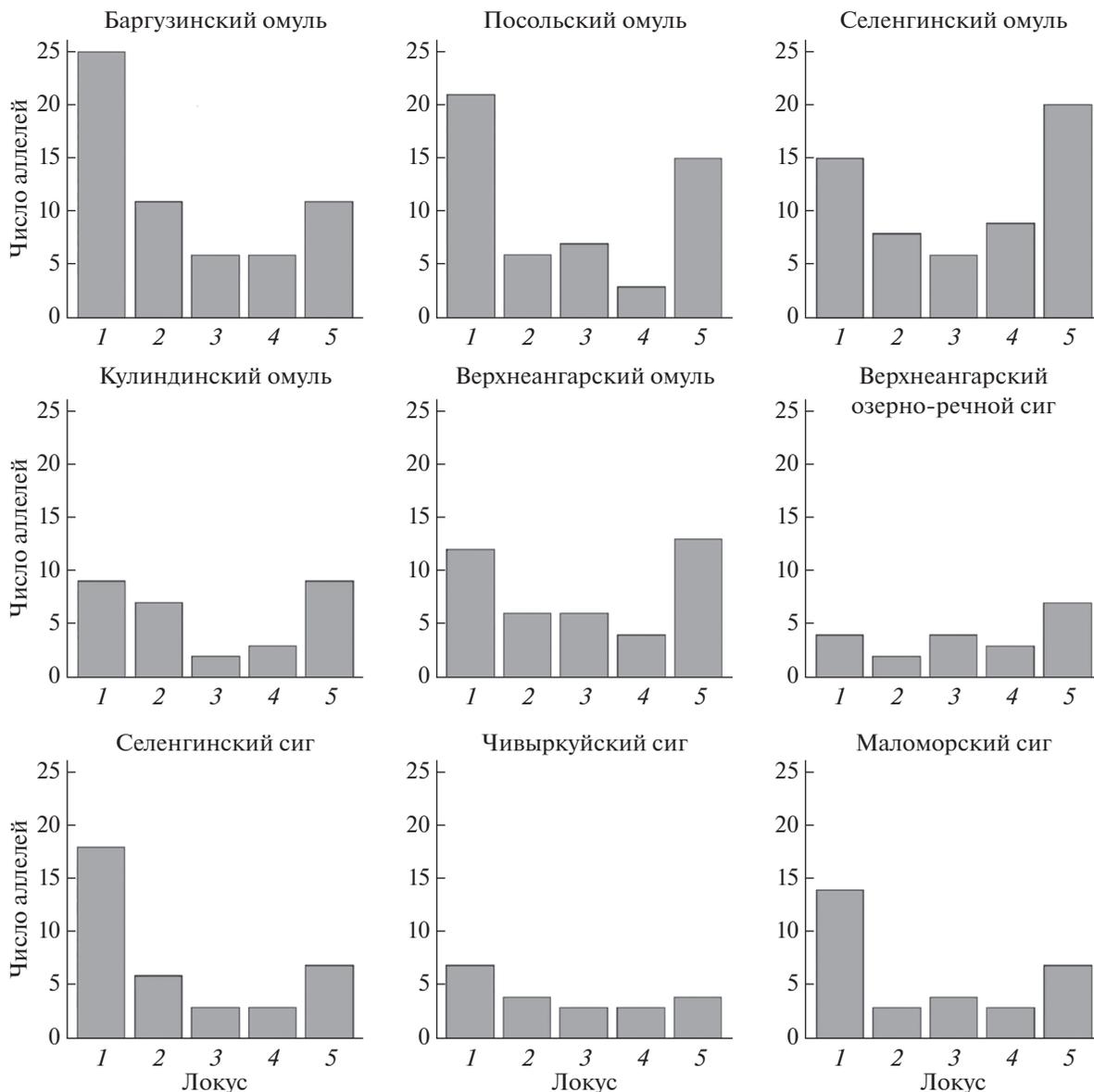


Рис. 2. Число аллелей по пяти микросателлитным локусам. 1 – Bwfl, 2 – Vom22b, 3 – Cocl23, 4 – Cam1, 5 – Cam5.

($F_{ST} = 0.012–0.038$). Общая картина дифференциации между проанализированными выборками наглядно представлена на дереве, построенном на основе полученных попарных значений F_{ST} методом ближайших соседей (NJ) в программе MEGA7.0 (рис. 3,б). На схеме, построенной методом ближайших соседей (NJ) на основе генетических расстояний между гаплотипами Da, реализованных в программе Population (рис. 3,а) только гаплотипы популяций кулиндинского омуля и верхнеангарского озерно-речного сига, демонстрирующих очень большую дифференциацию по значениям F_{ST} , образуют хорошо идентифицируемые отдельные группы.

Результаты обсчета данных в STRUCTURE для разного количества кластеров приведены на рис. 4, каждая вертикальная линия представляет долю участия обозначенных цветом кластеров в многолокусном генотипе особи.

При анализе в программе STRUCTURE для определения истинного количества кластеров применяют метод, предложенный Эванно в 2005 г. [32] и реализованный сервисом STRUCTURE HARVESTER [36]. Результат применения этой программы представлен на рис. 5. Наибольшее значение ΔK соответствует разделению анализируемых выборок на 6 кластеров. В то же время ΔK для случаев с возможным разделением на 7 и 8

Таблица 6. Оценки показателей попарной генетической дифференциации F_{ST}

Номер выборки	Омуль					Озерный сиг			Озерно- речной сиг
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	–								
2	0.030	–							
3	0.042	0.0362	–						
4	0.074	0.100	0.067	–					
5	0.202	0.194	0.204	0.135	–				
6	0.062	0.087	0.092	0.093	0.208	–			
7	0.097	0.104	0.118	0.127	0.218	0.027	–		
8	0.071	0.099	0.081	0.075	0.202	0.012	0.038	–	
9	0.183	0.214	0.149	0.190	0.306	0.217	0.204	0.188	–

кластеров и их дисперсия имеют близкие вероятные значения. Данный результат хорошо согласуется со схемами, построенными на основе генетических расстояний между гаплотипами Da (рис. 3,а) и попарных значений генетической дифференциации F_{ST} между выборками (табл. 6; рис. 3,б). Так, при разделении в программе STRUCTURE анализируемых выборок на кластеры (рис. 5) в очевидные кластеры обособились только выборки верхнеангарского озерно-речного сига и кулиндинского омуля. На схеме, построенной по генетическим расстояниям между гаплотипами Da, только гаплотипы популяций кулиндинского омуля и верхнеангарского озерно-речного сига, демонстрирующих очень большую дифференциацию по значениям F_{ST} , образуют хорошо идентифицируемые отдельные группы (рис. 3,а). Вместе с тем восемь из девяти анализируемых выборок показали статистически достоверные попарные различия по F_{ST} .

ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех проанализированных выборках присутствуют достоверные отклонения частот аллелей от равновесия Харди–Вайнберга (табл. 6): всего 22 случая, из которых в 17 наблюдался избыток гомозигот и в пяти – избыток гетерозигот. Известно, что наличие нуль-аллелей может приводить к проявлению ложной гомозиготности у гетерозиготных особей. Анализ на наличие “нулевых” аллелей (табл. 3, 5) показал, что из 17 выявленных случаев избытка гомозигот 11 может быть вызвано их присутствием. Остальные 11 случаев (6 – избы-

ток гомозигот и 5 – избыток гетерозигот) выявлены только в выборках из популяций омуля. Гипотезу о действующем на локусы отборе в данной ситуации можно отвергнуть, если считать, что микросателлитные локусы селективно нейтральны. Возможность инбридинга в случае отклонения в сторону гомозиготности можно рассматривать только для посольского омуля, в выборке которого недостаток гетерозигот наблюдался по всем исследованным локусам, независимо от наличия или отсутствия “нулевых” аллелей. Интенсивное искусственное воспроизводство посольского омуля, начавшееся с 50-х гг. 20-го в., на сегодняшний день полностью заместило естественное [13], что и могло привести к инбридингу. В трех наиболее полиморфных популяциях омуля по отдельным локусам наблюдается как снижение гетерозиготности (баргузинской – 22b и Soc123, селенгинской – Sam1 и верхнеангарской – Sam1), так и повышение (баргузинской – Sam1, селенгинской – 22b и верхнеангарской – Sam5). Такой результат можно объяснить эффектом Валунда, когда изменениям подвержена частота гетерозигот только в тех локусах, в которых имеется вариация аллельной частоты между субпопуляциями. При эффекте Валунда частота некоторых гетерозигот понижается, другие не подвергаются воздействию или же их частота повышается [37]. Что мы и наблюдаем в указанных популяциях, для которых наличие субпопуляционной структуры хорошо описано морфо-экологическими методами [13]. Что касается небольшой и географически обособленной популяции омуля из оз. Кулинда, для нее можно было бы ожидать повышенный уровень гомозиготности за счет интенсивного дрейфа генов и ин-

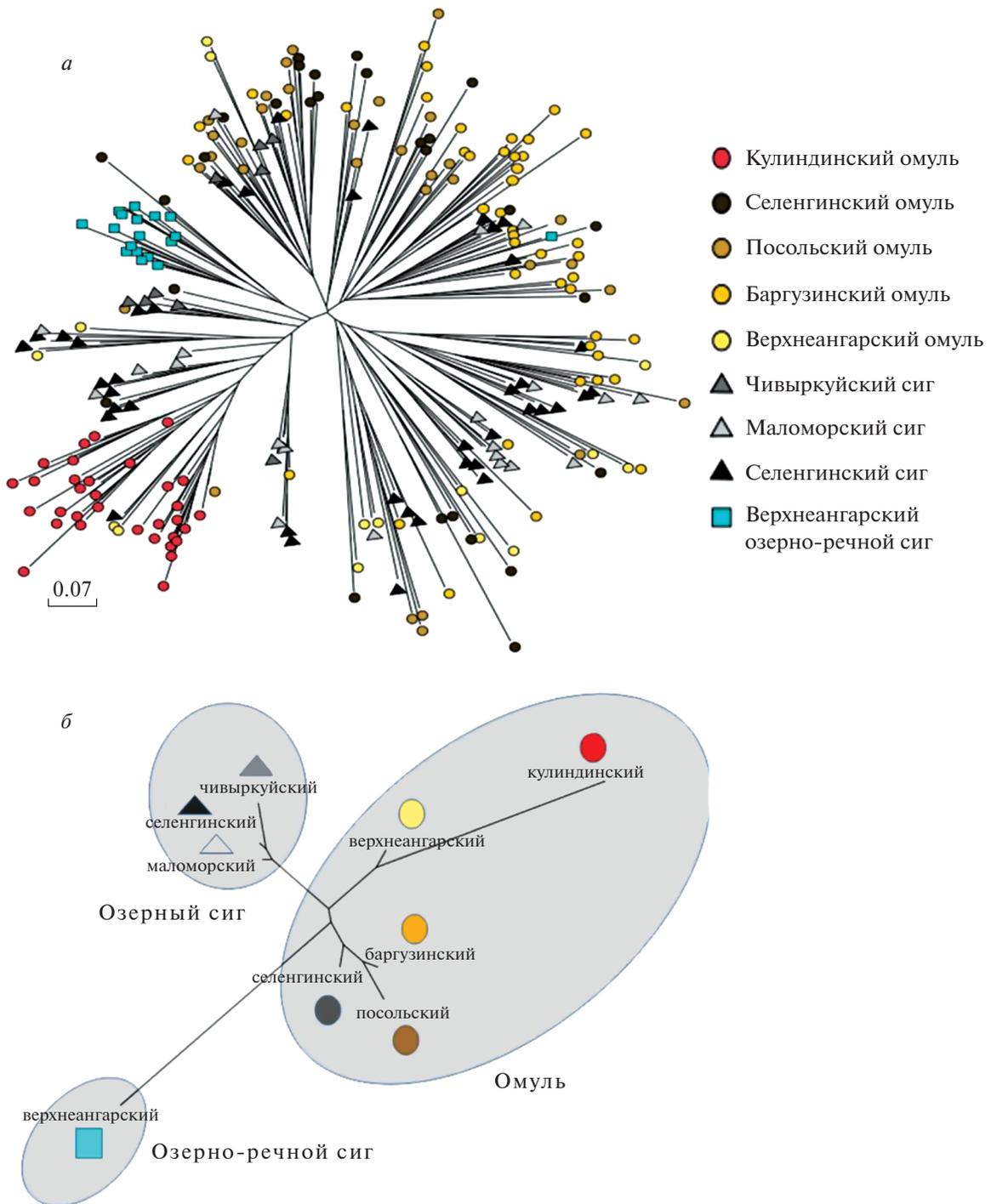


Рис. 3. Деревья, построенные по данным полиморфизма пяти микросателлитных локусов. *а* – для особей методом ближайших соседей (NJ – Neighbor Joining) на основе генетических расстояний между гаплотипами Da [24], реализованных в программе Population v1.2.32; *б* – для популяций методом NJ на основе попарных значений F_{ST} [21, 22], реализованных в программе Arlequin и MEGA7.0.

бридинга. Однако такого смещения не обнаружено. Напротив, выявлено преобладание гетерозигот в двух локусах (22b и Sam5). Если вспомнить, что оз. Кулинда расположено на пути р. Кичера, протекающей через еще одно вышерасположенное

Верхнекичерское озеро, в котором обитает этот же омуль, можно предположить, что в данном случае мы наблюдаем эффект смешивания обособленных субпопуляций, который приводит к смещению частот аллелей от соотношения Харди–Вайнберга.

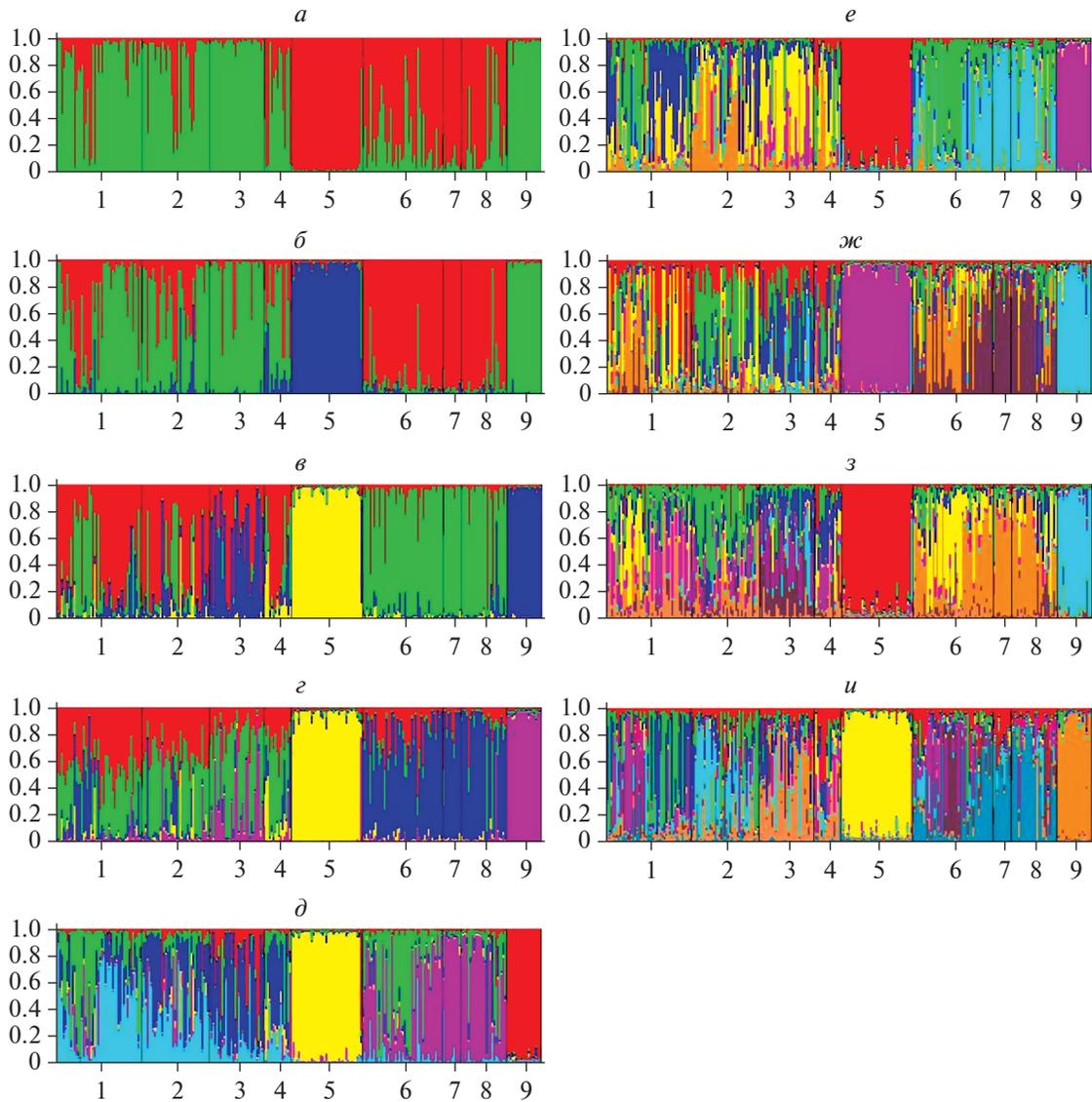


Рис. 4. Результаты обсчета данных в STRUCTURE для сиговых Байкала. $K = 2$ (а), 3 (б), 4 (в), 5 (г), 6 (д), 7 (е), 8 (ж), 9 (з), 10 (и) кластеров. Цифры отражают принадлежность особей к популяциям на основе мест вылова (1 – баргузинский омуль, 2 – посольский омуль, 3 – селенгинский омуль, 4 – верхнеангарский омуль, 5 – кулиндинский омуль, 6 – селенгинский сиг, 7 – чивыркуйский сиг, 8 – маломорский сиг, 9 – верхнеангарский озерно-речной сиг). Каждая вертикальная линия представляет долю участия обозначенных цветом кластеров в многоаллельном генотипе особи.

G–W-индекс свидетельствует о прохождении популяций через бутылочное горлышко [34]. Полученный результат согласуется с данными анализа генетического полиморфизма мтДНК. Так, П. Брузан и соавт., основываясь на результатах рестрикционного анализа мтДНК небольшого количества особей чивыркуйской и маломорской популяций, указывают на возможное резкое уменьшение численности озерного сига во время плейстоценовых похолоданий [10]. Полученный результат согласуется также с результатами молекулярно-филогенетических реконструкций на основе последовательностей гена цитохрома *b* мтДНК байкальских сиговых, согласно которому

дивергенция между байкальскими омулем и озерным сигом произошла в недавнем геологическом прошлом, предположительно после последнего Сартанского оледенения [38]. На схеме генетического родства между популяциями байкальских сиговых рыб, построенной на основе F_{ST} значений по данным полиморфизма пяти микросателлитных локусов, популяции омуля кластеризованы в одну группу с небольшими попарными генетическими расстояниями, что свидетельствует о недавнем времени дивергенции этих популяций (табл. 6; рис. 3,б). Популяции озерных сигов также кластеризованы в одну группу с небольшими попарными генети-

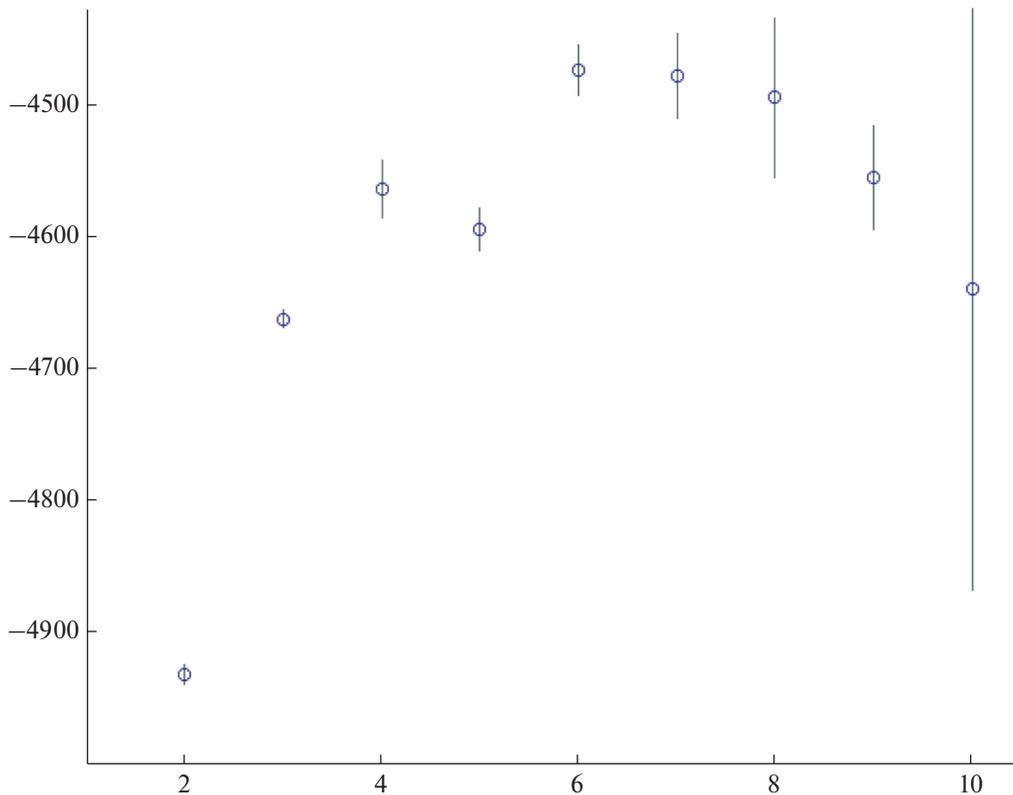


Рис. 5. График среднего правдоподобия $L(K)$ и дисперсии значений K . Значения функции ΔK (ось ординат) от возможного числа кластеров (ось абсцисс). Значение, отложенное по оси X , указывает на истинное число кластеров (в данном случае 6). Высота пика отражает выраженность популяционной структуры.

ческими расстояниями, что также свидетельствует об их недавней дивергенции (табл. 6; рис. 3,б). Расстояния между этими группами невелики, на основании чего можно заключить, что байкальский озерный сиг и байкальский омуль, в свою очередь, тоже разделились в недавнем геологическом прошлом, что соответствует данным упомянутого выше молекулярно-филогенетического анализа [13, 38]. На большом расстоянии от этих групп находится популяция кулиндинского омуля, что подтверждает географическую изолированность этой популяции от всего комплекса сиговых Байкала. Как упоминалось выше, проникновению омуля в оз. Кулинда (бассейн Байкала) мешают непреодолимые пороги, расположенные в верховьях р. Кичеры, вытекающей из озера [13, 14]. Полностью изолированная маленькая популяция быстро накапливает различия за счет большой скорости генетического дрейфа. Промежуточное положение верхнеангарского омуля между остальными байкальскими омулями и кулиндинским омулем явно свидетельствует о наличии потока генов из оз. Кулинда в р. Верхнюю Ангару и согласуется с географией мест нереста популяций. Также на большом расстоянии находится верхнеангарский озерно-речной сиг (рис. 3,б), что согласуется с гипотезой о продолжительной аллопатрической

изоляции его предковой формы за пределами озера и данными филогенетического анализа [38]. В то же время одинаковая удаленность кулиндинского омуля и верхнеангарского озерно-речного сига от омулей и озерных сигов Байкала не соответствует генетическим расстояниям, определенным на основании анализа полиморфизма мтДНК. Это очередной раз подтверждает, что с увеличением времени дивергенции генетические расстояния, определенные с помощью микросателлитов, становятся не пропорциональны времени по причине насыщения мутациями, приводящего к гомоплазии (конвергенции аллелей).

Использование иерархической кластеризации для выявления подразделенности внутри крупных кластеров широко применяется в популяционной генетике рыб, включая лососевые виды [39–41]. В целом рисунок разделения проанализированных выборок на кластеры в программе STRUCTURE (рис. 4) также подтверждает результаты молекулярно-филогенетического анализа [13, 38] и недавнее время дивергенции популяций омуля и озерного сига в присутствии потока генов. В очевидные кластеры обособились только выборки верхнеангарского озерно-речного сига и кулиндинского омуля (попарное значение $F_{ST} = 0.306$).

Таким образом, рисунок генетического полиморфизма, выявленный с использованием ядерных генетических маркеров (микросателлитов) путем сравнительного анализа большого количества популяций, представляющих все три вида байкальских сиговых, и сопоставление с имеющимися в литературе данными [5–13, 15, 42–44] окончательно подтверждает предположение о недавней симпатрической дивергенции байкальских омуля и озерного сига и их популяций [11]. Также полученные результаты согласуются с фактом географической изоляции предковой формы байкальского омуля в оз. Кулинда ледниково-тектонического происхождения [14]. Очевидная обособленность байкальского, нерестающего в р. Верхняя Ангара озерно-речного сига от остальных проанализированных выборок по всем анализируемым параметрам еще раз подтверждает гипотезу об изоляции (аллопатрической дивергенции) его предка за пределами озера в некоем рефугиуме, имеющем отношение к Ангаро-Енисейскому бассейну с последующим образованием енисейской речной формы, определяемой рядом авторов как *C. fluviatilis*, и конспецифичной ей байкальской формы, обитающей в оз. Байкал и его притоках, в которых и проходит нерест [13, 38, 45].

Работа выполнена в рамках темы Госзадания ЛИН СО РАН № 121032300154 при финансовой поддержке проекта РФФИ № 20-54-44017 Монг_а.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bowcock A., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J. et al.* High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites // *Nature*. 1994. V. 368. P. 455–457. <https://doi.org/10.1038/368455a0>
2. *Jarne P., Lagoda P.J.L.* Microsatellites, from molecules to populations and back // *Trends Ecol. Evol.* 1996. V. 11. № 10. P. 424–429. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)
3. *Li Y.-C., Korol A.B., Fahima T., Nevo E.* Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. № 6. P. 991–1007. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh073>
4. *López-Flores I., Garrido-Ramos M.A.* The repetitive DNA content of eukaryotic genomes // *Genome Dynamics*. 2012. V. 7. P. 1–28. <https://doi.org/10.1159/000337118>
5. *Мамонтов А.М., Яхненко В.М.* Биохимический полиморфизм омуля // *Морфология и экология рыб: Сб. статей / Под ред. Галазия Г.И.* Новосибирск, 1987. С. 14–19.
6. *Яхненко В.М., Осинев А.Г., Мамонтов А.М.* Морфологическая и популяционно-генетическая дифференциация байкальского озерного сига *Coregonus lavaretus baicalensis* Dybowski // *Генетика*. 1992. Т. 28. № 7. С. 139–150.
7. *Мамонтов А.М., Яхненко В.М.* Морфологическая и генетико-биохимическая оценка популяционной дифференциации байкальского озерно-речного сига *Coregonus lavaretus pidschian* (Coregonidae) // *Вопр. ихтиологии*. 1995. Т. 35. № 2. С. 175–181.
8. *Mamontov A.M., Yakhnenko V.M.* Ecological, morphological and iso-enzyme differentiation of coregonid populations in Lake Baikal // *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 1995. № 46. P. 13–23.
9. *Mamontov A.M., Yakhnenko V.M.* Izoenzyme polymorphism in Lake Baikal omul (*Coregonus autumnalis migratorius* Georgi) // *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 1998. № 50. P. 375–381.
10. *Brzuzan P., Yakhnenko V.M., Mamontov A.M. et al.* Mitochondrial DNA variation in whitefish *Coregonus lavaretus* from Lake Baikal as revealed by restriction analysis // *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 1998. № 50. С. 357–362.
11. *Суханова Л.В., Смирнов В.В., Смирнова-Залуми Н.С. и др.* Исследование популяций байкальского омуля *Coregonus autumnalis migratorius* методом рестрикционного анализа митохондриальной ДНК // *Вопр. ихтиологии*. 1996. Т. 36. № 5. С. 667–673.
12. *Суханова Л.В., Смирнов В.В., Смирнова-Залуми Н.С., Кирильчик С.В.* Новые данные по рестрикционному анализу мтДНК популяций байкальского омуля *Coregonus autumnalis migratorius* (Georgi) // *Сиб. экол. журн.* 1999. № 6. С. 655–658.
13. *Смирнов В.В., Смирнова-Залуми Н., Суханова Л.В.* Микроэволюция байкальского омуля: *Coregonus autumnalis migratorius* (Georgi). Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. 246 с.
14. *Базаров Д.Д.* Кайнозой Прибайкалья и Западного Забайкалья. Новосибирск: Наука, 1986. 181 с.
15. *Смирнов В.В., Воронов М.Г., Воронов А.В.* О внутривидовой структуре байкальского омуля *Coregonus autumnalis migratorius* (Georgi) // *Вопр. ихтиологии*. 1987. Т. 27. № 2. С. 342–345.
16. *Sambrook J., Fitch E.P., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
17. *Patton J.C., Galloway B.J., Fechhelm R.G., Cronin M.A.* Genetic variation of microsatellite and mitochondrial DNA markers in broad whitefish (*Coregonus nasus*) in the Colville and Sagavanirktok rivers in northern Alaska // *Can. J. Fisheries and Aquatic Sciences*. 1997. V. 54(7). P. 1548–1556. <https://doi.org/10.1139/f97-062>
18. *Гайкалов И.В., Ильина О.В., Кирильчик С.В., Суханова Л.В.* Описание трех микросателлитных локусов байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgi) // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 3. С. 423–426. <https://doi.org/10.1134/s1068162009010117>

19. *Turgeon J., Estoup A., Bernatchez L.* Species flock in the North American Great Lakes: Molecular ecology of the lake nipigon ciscoes (Teleostei: Coregonidae: Coregonus) // *Evolution*. 1999. V. 53. P. 1857–1871. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb04568.x>
20. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984. 480 с.
21. *van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P.* Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // *Mol. Ecol. Notes*. 2004. V. 4. P. 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
22. *Brookfield J.F.Y.* A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency // *Mol. Ecol.* 1996. V. 5. P. 453–455. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00098.x>
23. *Huang K., Ritland K., Dunn D.W. et al.* Estimating relatedness in the presence of null alleles // *Genetics*. 2016. V. 202(1). P. 247–260. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163956>
24. *Excoffier L., Lischer H.E.L.* Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resources*. 2010. V. 10(3). P. 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
25. *Cockerham C.C.* Analyses of gene frequencies // *Genetics*. 1973. V. 74. P. 679–700.
26. *Weir B., Cockerham C.C.* Estimating F-statistics for the analysis of population structure // *Evolution*. 1984. V. 38(6). P. 1358–1370. <https://doi.org/10.2307/2408641>
27. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33(7). P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
28. *Nei M., Tajima F., Tateno Y.* Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data // *J. Mol. Evol.* 1983. V. 19. P. 153–170. <https://doi.org/10.1007/BF02300753>
29. *Langella O.* Populations 1.2.31. 2002. http://bioinformatics.org/project/?group_id=84
30. *Rambaut A.* 2018. FigTree v.1.4.4 [accessed 25 October 2021]. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
31. STRUCTURE software (cited 2021 07). Available from: <https://rosenberglab.stanford.edu/datasets.html>
32. *Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. № 8. P. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
33. *Wang J.* The computer program STRUCTURE for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse // *Mol. Ecol. Resources*. 2017. V. 17. I. 5. P. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12650>
34. *Garza J.C., Williamson E.G.* Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci // *Mol. Ecol.* 2001. V. 10(2). P. 305–318. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2001.01190.x>
35. *Wright S.* Evolution and the Genetics of Populations: Variability within and Among Natural Populations. Univ. Chicago Press, 1978. V. 4. 590 p.
36. *Earl D.A., van Holdt B.M.* STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Conserv. Genet. Resources*. 2012. V. 4. № 2. P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
37. *Хедрик Ф.* Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 592 с.
38. *Sukhanova L.V., Smirnov V.V., Smirnova-Zalumi N.S. et al.* Molecular phylogeography of Lake Baikal Coregonid fishes // *Advanc. Limnol.* 2012. V. 63. P. 261–283. <https://doi.org/10.1127/advlim/63/2012/261>
39. *Vähä J.P., Erkinaro J., Niemelä E., Primmer C.R.* Life history and habitat features influence the within river genetic structure of Atlantic salmon // *Mol. Ecol.* 2007. V. 16. P. 2638–2654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03329.x>
40. *Zhivotovsky L.A., Yurchenko A.A., Nikitin V.D. et al.* Eco-geographic units, population hierarchy, and a two level conservation strategy with reference to a critically endangered salmonid, Sakhalin taimen *Parahucho perryi* // *Conserv. Gen.* 2014. V. 16. I. 2. P. 431–441. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0670-4>
41. *Semenova A., Stroganov A., Afanasiev K., Rubtsova G.* Population structure and variability of Pacific herring (*Clupea pallasii*) in the White Sea, Barents and Kara seas revealed by microsatellite DNA analyses // *Polar Biol.* 2015. V. 38. № 7. P. 951–965. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1653-8>
42. *Слободянюк С.Я., Кирильчик С.В., Мамонтов А.М., Скулин В.А.* Сравнительный рестрикционный анализ митохондриальной ДНК байкальского *Coregonus lavaretus baicalensis* и баунтовского *C. lavaretus baunti* озерных сигов // *Вопр. ихтиологии*. 1993. Т. 33. № 5. С. 631–636.
43. *Politov D.V., Gordon N.Y., Makhrov A.A.* Genetic identification and taxonomic relationships of six Siberian species of *Coregonus* // *Arch. Hydrobiology. Spec. Issues Advanced Limnology*. 2002. V. 57. P. 21–34.
44. *Politov D.V., Bickham J.W., Patton J.C.* Molecular phylogeography of Palearctic and Nearctic ciscoes // *Annales Zool. Fennici*. 2004. V. 41. № 1. P. 13–23.
45. *Бочкарёв Н.А., Зуйкова Е.И., Политов Д.В.* Таксономический статус и происхождение некоторых экологических форм сигов вида *Coregonus lavaretus* (L.) из водоемов Сибири // *Генетика*. 2017. Т. 53. № 8. С. 922–932.

Study of Population Structure of Baikal Whitefish Based on the Polymorphism of Microsatellite Loci

T. V. Sidorova^{a, *}, V. V. Smirnov^b, S. V. Kirilchik^a, and L. V. Sukhanova^a

^a*Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

^b*Baikal Museum of the Irkutsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Listvyanka, 664520 Russia*

*e-mail: tuyana_be@mail.ru

Using five microsatellite loci, Bwf1, Bom22b, Cocl23, Cam1, Cam5, we studied the polymorphism of nine populations of the Baikal complex of whitefish represented in the lake by three species: Omul *Coregonus migratorius* Georgi, lake whitefish *C. baicalensis* Dyb. and lacustrine river whitefish *C. pidschian* Gmelin. The generalized sample included 244 individuals. The populations of omul and lake whitefish can be divided into two separate groups with low pairwise genetic distances. The distances between the groups are small, from which it can be concluded that the lake whitefish and the omul have separated from each other in the recent geological past. At a great distance from these groups is the population of the Omul from the Lake Kulinda (basin of the Kichera River, the northern tributary of Lake Baikal), which confirms its isolation from the whole omul/lake whitefish complex. The intermediate position of the omul population of another northern tributary of the River Upper Angara between the other Baikal omul populations and the Kulinda omul suggests the presence of gene flow from Lake Kulinda to the northern tributaries of the lake. Also at a great distance is located Pyzhyan from the River Upper Angara, despite the partial overlap of terms and places of spawning with the Upper Angara omul. The revealed pattern of genetic polymorphism indicates a recent sympatric divergence of the Baikal omul, lake whitefish and their populations, confirms the fact of geographical isolation of one of the populations of the Baikal omul in Lake Kulinda of glacial-tectonic origin, and does not contradict the hypothesis of a long-term allopatric divergence of the ancestor of the Baikal lacustrine-riverine whitefish outside the lake.

Keywords: Baikal, whitefish, evolution, microsatellites, divergence.

**ЧАСТОТЫ ГАПЛОГРУПП Y-ХРОМОСОМЫ И ПРОЦЕССЫ
МИГРАЦИИ В ТРЕХ ПОКОЛЕНИЯХ ЖИТЕЛЕЙ МОСКВЫ**© 2022 г. И. Г. Удина¹, *, А. С. Грачева¹, О. Л. Курбатова¹¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: irina_udina@mail.ru

Поступила в редакцию 06.05.2022 г.

После доработки 09.06.2022 г.

Принята к публикации 10.06.2022 г.

В трех выборках из населения Москвы, представляющих три условных поколения, проведено генотипирование по 18 STR Y-хромосомы и собраны генетико-демографические данные путем анкетирования. Сравнительный статистический анализ выявил характерные для каждого поколения спектры и профили частот гаплогрупп Y-хромосомы; продемонстрировал достоверные различия между двумя старшими поколениями и молодым поколением жителей Москвы, в частности по частоте гаплогруппы N. Показано статистически достоверное накопление в молодом поколении “южных по происхождению” гаплогрупп, привносимых с потоками мигрантов. Особенности распределения частот гаплогрупп Y-хромосомы в трех поколениях москвичей хорошо согласуются с параметрами миграционных потоков в Москву в последние десятилетия и с данными анкетирования о местах происхождения мигрантов и их этническом составе. Результаты исследования указывают на необходимость своевременного обновления и актуализации популяционных референтных баз данных для целей ДНК-идентификации в мегаполисах, а также на необходимость дополнения молекулярно-генетического анализа генетико-демографическими данными, полученными путем анкетирования.

Ключевые слова: Москва, популяция, генофонд, гаплогруппы Y-хромосомы, миграционные процессы, поколения.

DOI: 10.31857/S0016675822110121

Исследования по генетике человека начались в лаборатории популяционной генетики ИОГен РАН практически с момента ее основания. Сотрудники лаборатории под руководством и с участием ее заведующего — академика Юрия Петровича Алтухова разрабатывали проблемы стабилизирующего отбора, неспецифической биологической устойчивости организма человека к заболеваниям, космической генетики с использованием доступных в то время классических генетических маркеров (биохимических и иммуногенетических), а также антропометрических признаков. Начиная с 1980-х годов особое внимание уделялось демографической генетике. Основным объектом стало население Москвы — крупнейшего мегаполиса РФ. Были определены основные параметры миграции — основного фактора популяционной динамики городского населения — за полуторазековой период; показано, что при современных темпах миграционных процессов генофонд популяции практически полностью обновляется за 4–6 поколений (обзор, см. [1]).

В настоящем исследовании объединены два направления работы лаборатории — исследова-

ние генетических маркеров (теперь маркеров ДНК) и анализ генетико-демографических процессов. Ранее при изучении генетико-демографических процессов в мегаполисах показаны гендерные различия в количественных и качественных характеристиках миграционных потоков, включающие различия в интенсивности (коэффициенты миграции) и дальности (миграционное расстояние) миграции и этнорегионального состава мигрантов [2–5]. В последние десятилетия интенсифицировался приток в Москву мигрантов из республик Средней Азии, Закавказья и северокавказских республик в составе РФ [5], что приводит к увеличению генетического разнообразия популяции, в особенности ее молодого поколения. В этой связи особый интерес представляют однородительские молекулярно-генетические маркеры — гаплогруппы Y-хромосомы и мтДНК, которые маркируют миграционные потоки в мегаполис, соответственно, по мужской и женской линиям, и с помощью которых можно охарактеризовать приток в генофонд населения мегаполиса не характерных для коренного населения маркеров.

Учет генетико-демографических параметров миграции позволяет прогнозировать динамику частот однородительских маркеров в поколениях под действием миграции с учетом гендерных различий. Наличие динамики генофонда популяции в поколениях диктует необходимость постоянного обновления и актуализации популяционных/референтных баз данных по генетическим маркерам для целей ДНК-идентификации, включая однородительские маркеры.

Цель данного исследования – изучение профиля частот гаплогрупп Y-хромосомы в разных поколениях населения Москвы и влияния миграционных процессов на межпоколенные различия частот гаплогрупп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучены выборки жителей Москвы из трех поколений. Выборка **АМ** собрана в 2001 г. и содержит данные о москвичах, средний год рождения которых – 1949 для мужчин и 1948 для женщин; выборка **БМ** содержит данные о новорожденных, родившихся в Москве в 2017–2018 гг.; выборка **ВМ** содержит данные о мужчинах в среднем 1985 года рождения. Можно считать, что эти три выборки характеризуют три условных поколения москвичей: “деды” (АМ), “родители” (ВМ) и “дети” (БМ).

Формирование выборок осуществляли посредством сбора образцов крови москвичей на базе медицинских учреждений г. Москвы и одновременного сбора анкет с генетико-демографическими данными (о месте проживания, годе рождения, месте рождения, этнической принадлежности жителя Москвы, включенного в выборку, а также его предков в двух предыдущих поколениях). От каждого анкетированного получено информированное согласие на использование биологического образца и генетико-демографических данных в анонимном виде в популяционном исследовании. Для выборки БМ проведено анкетирование матерей. Генетико-демографические параметры в изученных выборках представлены в [5], а данные о молекулярных маркерах – аутомных STR в выборке АМ, ранее представлены в [6, 7].

ДНК из образцов крови выделена стандартным методом с применением набора реактивов фирмы “Изоген” (Москва). Проведено гентипирование образцов ДНК по 18 STR Y-хромосомы на базе ООО “Гордиз” (Москва) с последующим определением принадлежности установленного генотипа к гаплогруппе Y-хромосомы с помощью Интернет-предиктора [8].

Статистический анализ проведен в программе “Statistica”, использованы также алгоритмы программы WinPeri [9], для надежности выводов при

определении оценок вероятности использовали одновременно обе программы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение гаплогрупп

К гаплогруппам Y-хромосомы, выявленным во всех трех выборках жителей Москвы, следует отнести следующий спектр гаплогрупп: R1a, R1b, E1b1b, N, T, I1b и I2, а также J1 и J2. В целом выявленные частоты гаплогрупп в выборках жителей г. Москвы соответствуют частотам, характерным для русского населения [10]. В отношении спектра присутствующих гаплогрупп и их частотного профиля три изученные выборки различаются (табл. 1). Количество выявленных гаплогрупп варьирует от 12 в выборках АМ и ВМ до 26 в выборке БМ и составляет 28 гаплогрупп в суммарной выборке.

Превалирующей гаплогруппой в изученных выборках из населения Москвы является гаплогруппа R1a (с минимальной частотой 42.8% в выборке ВМ и максимальной – в выборке АМ – 52.1%), в суммарной выборке частота 45.6%. Частота гаплогруппы N варьирует от 7.3 в выборке БМ до 17.8% в выборке АМ, а в суммарной выборке составляет 9.1%. При сравнении частот гаплогруппы N в трех поколениях выявлена гетерогенность ($G = 8.0721$, $d.f. = 2$, $P < 0.025$). Различия между двумя старшими поколениями (АМ + ВМ) и самым молодым поколением (БМ) по частоте гаплогруппы N достоверны ($G = 7.2455$, $d.f. = 1$, $P < 0.01$; $P = 0.007$, $OR = 2.22$, $CI_{95\%} = 1.20–4.07$). Достоверны также и различия по частотам гаплогруппы N между самым старшим и самым младшим поколениями ($G = 6.9270$, $d.f. = 1$, $P < 0.01$). Частота гаплогруппы R1b варьирует от 4.1 в выборке АМ до 7.3% в выборке ВМ, а в суммарной выборке составляет 6.4%. Представленность гаплогруппы E1b1b в изученных выборках невелика: минимальная – 1.4% в выборке АМ и максимальная в выборке ВМ – 4.3%. Особенности распространения рассмотренных гаплогрупп в изученных выборках находятся в хорошем соответствии с ранее установленными географическими ареалами их распространения в Европейской части России (R1a, E1b1b1, R1b и N) [11].

Частота гаплогруппы I1 варьирует незначительно: от 5.5% в выборке АМ до 6.3% в выборке БМ, что вполне согласуется с географическими особенностями распространения этой гаплогруппы в Европе [12]. Гаплогруппа I2 представлена с минимальной частотой (8.2%) в выборке АМ и с максимальной частотой в выборке ВМ – (17.7%), в суммарной московской выборке ее частота составляет 11.4%; особенности представленности этой гаплогруппы также хорошо согласуются с географическими особенностями распространения в

Таблица 1. Распределение гаплогрупп Y-хромосомы в изученных выборках из населения г. Москвы

Гаплогруппа	АМ		ВМ		БМ		Москва суммарно	
	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>
C3*	0	0	0	0	7	0.018	7	0.012
E1b1b	1	0.014	2	0.021	17	0.043	20	0.035
G2a*	0	0	3	0.031	7	0.018	10	0.018
G2c*	0	0	0	0	1	0.003	1	0.002
H*	0	0	0	0	1	0.003	1	0.002
I1	4	0.055	6	0.063	21	0.053	31	0.054
I2a	0	0	0	0	1	0.003	1	0.002
I2a(×I2a1)	6	0.082	16	0.167	35	0.088	57	0.100
I2a1	0	0	0	0	2	0.005	2	0.004
I2b(×I2b1)	0	0	0	0	1	0.003	1	0.002
I2b1	0	0	1	0.010	3	0.008	4	0.007
J1*	1	0.014	1	0.010	16	0.040	18	0.032
J2a*	0	0	5	0.052	15	0.038	20	0.035
J2a1b*	2	0.027	0	0	3	0.008	5	0.009
J2ab1*	0	0	0	0	1	0.003	1	0.002
J2a1bh*	1	0.014	0	0	0	0	1	0.002
J2a4(×bh)*	0	0	0	0	3	0.008	3	0.005
J2b*	0	0	0	0	7	0.018	7	0.012
J2a1×J2a1-bh*	1	0.014	0	0	0	0	1	0.002
L*	0	0	0	0	2	0.005	2	0.004
N	13	0.178	12	0.125	29	0.073	54	0.095
R1a	38	0.521	41	0.427	181	0.453	260	0.457
R1b	3	0.041	7	0.073	26	0.065	36	0.063
R2*	0	0	0	0	4	0.010	4	0.007
T*	2	0.027	1	0.010	5	0.013	8	0.014
O2*	0	0	1	0.010	0	0	1	0.002
O3*	0	0	0	0	5	0.013	5	0.009
Q*	1	0.014	0	0	7	0.018	8	0.014
Всего	73	1	96	1	400	1	569	1

Примечание. * – “южные” по происхождению гаплогруппы; *N* – число, а *f* – численная доля гаплогруппы в выборке.

Европе [12]. Однако наблюдаемые различия по оценкам частоты этой гаплогруппы в трех выборках недостоверны. С тем, чтобы точнее охарактеризовать особенности распространения гаплогрупп I1 и I2, проведен анализ соотношения частот этих гаплогрупп в изученных выборках, по результатам которого можно предположить различия по соотношению рассматриваемых гаплогрупп в разных поколениях москвичей. В табл. 2 представлены особенности распространения гаплогрупп I1 и I2 в трех выборках из населения Москвы и в суммарной выборке. Во всех выборках преобладает гаплогруппа I2. Интересно, что в выборке АМ соотношение I2/I1 равно 1.5, а в выборках ВМ соотношение практически в два раза выше. Таким образом,

продемонстрирована гетерогенность разных поколений мужского населения г. Москвы по встречаемости этих гаплогрупп.

Частота гаплогруппы J1 в московском населении довольно низкая и варьирует от 1% (ВМ) до 4% (БМ). В населении Москвы с относительно высокой частотой выявлена гаплогруппа J2, которая варьирует по частоте от 5.2 в выборке ВМ до 7.3% в выборке БМ и составляет в суммарной выборке 6.7% (табл. 3). Аналогично проведенному анализу для гаплогрупп I1 и I2, проведен анализ соотношения частот гаплогрупп J1 и J2 в трех выборках, по результатам которого можно предположить различия по соотношению рассмотренных гаплогрупп в разных поколениях москвичей.

Таблица 2. Соотношение частот гаплогрупп I1 и I2 в изученных выборках из населения г. Москвы

Гаплогруппы	AM <i>N</i> = 73		BM <i>N</i> = 96		BM <i>N</i> = 400		Москва суммарно <i>N</i> = 569	
	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>
I1	4	0.055	6	0.063	21	0.053	31	0.054
I2	6	0.082	17	0.177	42	0.105	65	0.114
Всего	10	0.137	23	0.240	63	0.158	96	0.168
Соотношение гаплогрупп I1 и I2								
I1/I2	0.667		<i>0.353</i>		0.500		0.477	
I2/I1	<i>1.500</i>		2.833		2.000		2.097	

Примечание. Полужирным шрифтом выделены максимальные значения, курсивом – минимальные.

Таблица 3. Соотношение частот гаплогрупп J1 и J2 в изученных выборках из населения г. Москвы

Гаплогруппы	AM <i>N</i> =73		BM <i>N</i> =96		BM <i>N</i> =400		Москва суммарно <i>N</i> =569	
	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>
J1	1	0.014	1	0.010	16	0.040	18	0.032
J2	4	0.055	5	0.052	29	0.073	38	0.067
Всего	5	0.069	6	0.062	45	0.113	56	0.098
Соотношение гаплогрупп J1 и J2								
J1/J2	0.250		<i>0.200</i>		0.552		0.474	
J2/J1	4.000		5.000		<i>1.813</i>		2.111	

Примечание. Полужирным шрифтом выделены максимальные значения, курсивом – минимальные.

чей. Во всех выборках превалирует гаплогруппа J2. Суммарно группы J1 и J2 представлены в выборке BM с самой высокой частотой – 11.3%, а в выборке AM с самой низкой частотой – 6.2%. Соотношение J2/J1 в разных поколениях различно, так, например, соотношение равно 4.0 в выборке AM и 5.0 в выборке BM, а в выборке BM – 1.81. Таким образом, продемонстрирована гетерогенность разных поколений мужского населения г. Москвы по встречаемости этих гаплогрупп. Однако непосредственное сравнение частот в разных выборках жителей Москвы не достигает порога достоверности. Следует отметить, что гаплогруппы J1 и J2 входят в группу “южных по происхождению” гаплогрупп, которые максимально представлены в самом молодом поколении. Географические особенности распространения гаплогрупп J1 и J2 представлены в [13].

Распределение крупных гаплогрупп

Для выявления различий частотных профилей гаплогрупп Y-хромосомы в трех выборках из мужского населения г. Москвы, относящихся к разным поколениям, проведен еще один вариант

статистического анализа, для которого гаплогруппы были объединены в более крупные категории, а редкие гаплогруппы, представленные в суммарной выборке с частотой менее 2% каждая, объединены в класс “RH”. Частоты по объединенным классам гаплогрупп в московских выборках представлены в табл. 4.

Сравнительный статистический анализ как для всех трех московских выборок ($G = 23.0686$, $d.f. = 16$, $P > 0.05$), так и для попарных сравнений выборок AM с BM ($G = 13.5414$, $d.f. = 8$, $P > 0.05$), AM с BM ($G = 5.8370$, $d.f. = 8$, $P > 0.05$) и BM с BM ($G = 9.9176$, $d.f. = 8$, $P > 0.05$) не выявил достоверно значимых различий. Возможно, что при увеличении размеров выборок различия между выборками AM и BM достигнут первого порога достоверности. Однако сравнение двух объединенных старших выборок, между которыми не было достоверных различий по профилю частот рассматриваемых гаплогрупп, с самым молодым поколением выявило достоверные различия между ними ($G = 18.0593$, $d.f. = 8$, $P < 0.025$). Следовательно, помимо установленных достоверных различий между старшим и младшим поколениями по присутствию гаплогруппы N, а также гаплогрупп “юж-

Таблица 4. Распределение крупных гаплогрупп Y-хромосомы в изученных выборках из населения г. Москвы

Гаплогруппа	АМ		ВМ		БМ		Москва суммарно	
	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>	<i>N</i>	<i>f</i>
E1b1b	1	0.014	2	0.021	17	0.043	20	0.035
I1	4	0.055	6	0.063	21	0.052	31	0.054
I2	6	0.082	17	0.177	42	0.104	65	0.114
J1	1	0.014	1	0.010	16	0.040	18	0.032
J2	4	0.055	5	0.052	29	0.073	38	0.067
N	13	0.178	12	0.125	29	0.073	54	0.095
R1a	38	0.520	41	0.427	181	0.452	260	0.457
R1b	3	0.041	7	0.073	26	0.065	36	0.063
RH*	3	0.041	5	0.052	39	0.098	47	0.083
Всего	73	1	96	1	400	1	569	1

Примечание. * RH – объединенная группа редких гаплогрупп, частота каждой из которых в суммарной выборке менее 2%. Другие обозначения см. табл. 1.

ных по происхождению” выявлены достоверные различия по профилю частот крупных гаплогрупп между поколениями москвичей.

Особенности распределения “южных по происхождению” гаплогрупп

Частоты “южных по происхождению” гаплогрупп (С3, G2a, G2с, H, J1, J2, L, O2, O3, Q, R2 и T) в трех выборках из населения Москвы и в суммарной выборке представлены на рис. 1. Все перечисленные гаплогруппы возникли и имеют области максимального распространения значительно южнее географического положения Москвы [13–22]. Гаплогруппа E1b1b1 имеет ближневосточное происхождение, но в связи с высокой ее представленностью в Западной Европе и возможным

путем ее проникновения в генофонд мегаполиса, в том числе и с запада, эта гаплогруппа не включена в группу “южных по происхождению” гаплогрупп [11, 13].

Присутствие в генофонде “южных по происхождению” гаплогрупп для разных поколений москвичей различно. Так, например, в выборках АМ их доля составляет примерно 11%, а максимальная доля выявлена в выборке новорожденных – 21.0%. В суммарной выборке из населения Москвы доля “южных по происхождению” гаплогрупп составляет 18.1%. Тест на гетерогенность оценок частоты “южных по происхождению” гаплогрупп выявил достоверные различия трех выборок: $G = 8.1226, d.f. = 1, P < 0.005$. Сравнение самого старшего поколения с младшим показало достоверные различия по G -критерию: $G = 4.3955,$

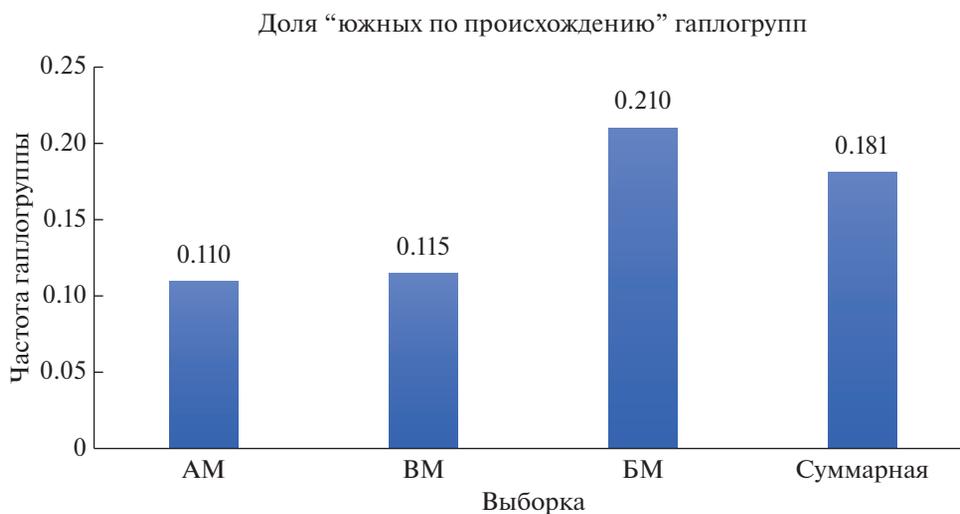


Рис. 1. Доля “южных по происхождению” гаплогрупп Y-хромосомы в изученных выборках из населения г. Москвы.

$d.f. = 1, P < 0.05$. Сравнение условно среднего поколения с младшим выявило достоверные различия по присутствию рассматриваемой категории гаплогрупп: $G = 4.9649, d.f. = 1, P < 0.05$. Сравнение самого старшего поколения с условно средним не выявило достоверных различий: $G = 0.010, d.f. = 1, P > 0.05$. В этой связи, в новом варианте статистического анализа оба старших поколения были объединены для анализа частот “южных по происхождению” гаплогрупп в изученных выборках (при сравнении с младшим поколением): $G = 9.6243, d.f. = 1, P < 0.005$.

Таким образом, очевидна гетерогенность поколений москвичей в отношении разнообразия гаплогрупп Y-хромосомы, прослежена динамика накопления в молодом поколении “южных по происхождению” гаплогрупп (С3, G2a, G2c, H, J1, J2, L, O2, O3, Q, R2 и Т).

Остановимся на присутствии некоторых гаплогрупп в географических регионах, которые служат источником миграции. Так, например, в большинстве этнических групп Северного Кавказа присутствует от 20 до 40% каждой из гаплогрупп — G2a или J1. В Закавказье (Грузия, Армения, Азербайджан) гаплогруппа J2a является одной из основных, но там также высоки частоты гаплогрупп J1 и G2a. Гаплогруппа J2a также достигает высоких частот в Анатолии, в Чечне и Ингушетии.

Рассмотрим также гаплогруппу Т, которую в анализе также рассматриваем как “южную по происхождению” гаплогруппу Y-хромосомы. Гаплогруппа Т является редкой гаплогруппой в Европе. Она составляет 1% в населении большей части континента, за исключением Греции, Македонии и Италии, где ее частота превышает 4%, а в Иберии она составляет 2.5%, достигнув 10% в Кадисе и более 15% на Ибисе. Максимальная частота по всему миру гаплогруппы Т наблюдается в Восточной Африке (Эритрея, Эфиопия, Сомали, Кения, Танзания), на Ближнем Востоке (в Южном Ираке, Юго-Западном Иране, Омане и в Южном Египте) и на Кавказе, где на ее долю приходится примерно от 5 до 15% мужских линий [13–16].

Гаплогруппа L также из гаплогрупп “южных по происхождению” имеет области максимального распространения в Южной Азии (11.2%), Индии (может достигать в отдельных племенах 68%), Пакистане (11.6%), и Афганистане (9.5%). Известно, что у народов, которые проживают в Средней Азии, широко распространена рассматриваемая гаплогруппа: у таджиков (Таджикистан) гаплогруппа выявлена у 7.7%, у узбеков — 5–9.5% (Узбекистан, Афганистан), уйгуров — (Киргизия) (16.7%) у киргизов — (5.2%). Чрезвычайно высока представленность этой гаплогруппы у лазов (Грузия) (41%), у грузин (достигает в отдельных районах 21%), а также у отдельных народов Дагестана

(до 11.7% у татов), широко распространена у чеченцев и ингушей (до 7%) [20].

Гаплогруппа H, выявленная в генофонде населения мегаполиса, широко представлена у цыган в Индии (до 60%), в Индии частота достигает 35%, у калашей (Пакистан) (20.5%), у таджиков (Душанбе) (12.5%), курдов из Туркмении (6%). Очевидно, что гаплогруппы G2a, J1, J2, L и Т могут быть привнесены в генофонд мегаполиса с миграцией мужского населения из южных регионов РФ, в первую очередь из Северо-Кавказского и Южного Федеральных округов, а также из сопредельных стран. Гаплогруппы L, J2, H, а также O (с чрезвычайно широким распространением в Восточной и Юго-Восточной Азии с частотой 60–100%) могут попадать в генофонд населения Москвы с потоками мигрантов из Средней Азии, интенсивность которых возросла за последние десятилетия [5, 13, 19–21].

При сохранении данной тенденции в миграции мужского населения в мегаполис следует ожидать увеличения доли “южных по происхождению” гаплогрупп Y-хромосомы в мужском населении г. Москвы и постепенного замещения характерных для основного населения мегаполиса гаплогрупп. Очевидно, что в основном эта тенденция затронет две наиболее распространенные в изученных выборках мегаполиса гаплогруппы — N и R1a. В отношении гаплогруппы N действительно установлено достоверное снижение ее присутствия в генофонде мегаполиса (см. выше).

Рассмотрим для примера гаплогруппу G2a, также вошедшую в группу “южных по происхождению” гаплогрупп Y-хромосомы. Гаплогруппа G2 распространена у сванов (92%), осетин (62%), мегрелов (до 75%), абхазов (48%), адыгов (46%), грузин (40%), в Карачаево-Черкессии и Кабардино-Балкарии (до 40%). В изученном массиве данных эта гаплогруппа в Москве обнаружена у десяти жителей. Гаплогруппа G2a проникает в генофонд населения мегаполиса, вероятнее всего, с потоками мигрантов с Кавказа, где она широко распространена [13–15]. В табл. 5 представлены данные о выявленных случаях присутствия в генофонде населения мегаполиса этой гаплогруппы. С помощью специального интернет-предиктора на основании данных генотипирования по 18 STR Y-хромосомы определены субклады гаплогруппы G2a в наших выборках [13]. Установлено присутствие трех субклад гаплогруппы Y-хромосомы G2a: G2a-P16 (G2a1a), G2a-M406 (G2a2b1) и G2a-L497 (G2a2b2a1b). В самом старшем поколении рассматриваемая гаплогруппа не выявлена. Таким образом, гаплогруппа G2a, равно как и другие “южные по происхождению” гаплогруппы (С3, G2c, J1, J2, L, O2, O3, Q, R2 и Т), могут быть определены как значимые для ДНК-идентификации

Таблица 5. Распределение подвариантов (субклад) и ветвей гаплогруппы G2a в изученных выборках из населения г. Москвы

Подвариант (субклада) гаплогруппы G2a*	Суммарная выборка***		Выборка ВМ		Выборка БМ	
	N	%	N	%	N	%
G2a-P16 (G2a1a)**	3	30	1	33.3	2	28.5
G2a-M406 (G2a2b1)	5	50	2	66.7	3	43.0
G2a-L497(G2a2b2a1b)	2	20	—	—	2	28.5
Всего	10	100	3	100	7	100

Примечание. * – подвариант (субклада) гаплогруппы G2a определен(а) с помощью интернет-предиктора гаплогрупп Y-хромосомы [8]. ** – указано обозначение ветви гаплогруппы G2a в соответствии с деревом ветвей гаплогруппы Y-хромосомы G2 [13]. *** – в выборке АМ гаплогруппа G2a не обнаружена.

маркеры, с помощью которых можно устанавливать происхождение их носителей в мегаполисах.

Из процитированных выше материалов, иллюстрирующих особенности географического распространения “южных по происхождению” гаплогрупп (С3, G2с, J1, J2, L, O2, O3, Q, и T), очевидно, что гаплогруппы проникают в генофонд мегаполиса с потоками мигрантов из южных регионов, что подтверждается данными анкетирования.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование позволило установить характерные спектры и профили частот гаплогрупп Y-хромосомы в выборках жителей Москвы из разных поколений и продемонстрировало гетерогенность выборок в отношении разнообразия гаплогрупп. Показано увеличение доли “южных по происхождению” гаплогрупп (С3, G2a, G2с, H, J1, J2, L, O2, O3, Q, R2 и T), ранее не характерных для мегаполиса, в молодом поколении. Выявлено снижение частоты гаплогруппы N в молодом поколении жителей мегаполиса.

Различия генетической структуры трех разновозрастных выборок мужского населения Москвы по частотам гаплогрупп Y-хромосомы находятся в хорошем соответствии с данными о миграционных потоках в столицу [1, 5], а также с данными о местах происхождения жителей Москвы и об этническом составе выборок, полученных путем анкетирования [5].

Доля русских в старшей выборке составляет 85, в младшей – 73%. Этнический состав “младшей” выборки наиболее разнообразен (27 национальностей); в “старшей” выборке – 14. Помимо русских, в “младшую” выборку входят (по убыванию численности): киргизы, дагестанцы, армяне, таджики, татары, украинцы, узбеки, чеченцы, азербайджанцы, евреи, белорусы, чуваша, осетины, молдаване, корейцы, казахи, ингуши, гагаузы, кабардинцы, калмыки, якуты, монголы, сирийцы, турки, туркмены, египтяне.

В “старшей” выборке 3/4 москвичей родилось в Центральном Федеральном округе, в том числе чуть больше половины – в самой столице. В “младшей” выборке распределение по местам рождения совсем иное – в ЦФО родилось чуть больше половины анкетированных, в самой Москве – одна треть, много уроженцев Южного и Северо-Кавказского Федеральных округов и стран “ближнего зарубежья” – Киргизии, Украины, Узбекистана, Таджикистана, Армении (страны перечислены в порядке убывания числа мигрантов из них в Москву).

Данные о параметрах миграции позволяют прогнозировать временную динамику частот гаплогрупп в населении мегаполиса под воздействием миграционных процессов, способствующих быстрому обновлению генофонда популяции в поколениях. При этом необходимо учитывать гендерные различия миграционных потоков – для анализа динамики частот маркеров Y-хромосомы необходимо использовать данные об интенсивности мужской миграции и этническом составе мужчин-мигрантов.

Полученные результаты указывают на важность учета возрастного фактора при создании популяционных референтных баз данных для ДНК-идентификации личности в мегаполисах, а также на необходимость постоянного обновления и актуализации таких баз данных и сбора генетико-демографических данных параллельно со сбором биологических образцов с целью изучения генетических маркеров [23].

Авторы благодарят москвичей, принявших участие в анкетировании и предоставивших свои биологические образцы, а также руководство медицинских учреждений Москвы, на базе которых был проведен сбор материала, за ценное сотрудничество.

Исследование проведено в рамках реализации Научно-технической программы Союзного государства “Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей челове-

ка на основе изучения генофондов регионов Союзного государства” (“ДНК-идентификация”, мероприятие 10).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Исследование одобрено Этическим комитетом ИОГен РАН. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие (в выборке новорожденных согласие было получено от их матерей). Демографические данные, полученные в результате анкетирования, и результаты исследования представлены и хранятся в анонимной (обезличенной) форме.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курбатова О.Л., Янковский Н.К. Миграция – основной фактор популяционной динамики городского населения России // Генетика. 2016. Т. 52. № 7. С. 831–851. <https://doi.org/10.7868/S0016675816070067>
2. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Веремейчик В.М. и др. Особенности генетико-демографических процессов в населении трех мегаполисов в связи с проблемой создания генетических баз данных // Генетика. 2013. Т. 49. № 4. С. 513–522. <https://doi.org/10.7868/S0016675813040085>
3. Курбатова О.Л., Удина И.Г., Грачева А.С. и др. Генетико-демографические параметры населения г. Новосибирска // Генетика. 2018. Т. 54. Приложение. С. S74–S84. <https://doi.org/10.1134/S0016675818130106>
4. Курбатова О.Л., Удина И.Г., Грачева А.С. и др. Генетико-демографические параметры населения г. Санкт-Петербурга. Миграционные процессы // Генетика. 2019. Т. 55. № 9. С. 1071–1082. <https://doi.org/10.1134/S001667581909008X>
5. Курбатова О.Л., Грачева А.С., Победоносцева Е.Ю., Удина И.Г. Генетико-демографические параметры населения г. Москвы. Миграционные процессы // Генетика. 2021. Т. 57. № 12. С. 1438–1449. <https://doi.org/10.31857/S0016675821120080>
6. Zhivotovsky L.A., Veremeichyk V.M., Mikulich A.I. et al. Population survey on the distribution of STR frequencies in Belarus // Forensic Sci. Int. 2007. V. 172(2–3). P. 156–160.
7. Zhivotovsky L.A., Veremeichyk V.M., Kuzub N.N. et al. A reference data base on STR allele frequencies in the Belarus population developed from paternity cases // Forensic Sci. Int. Genet. 2009. V. 3(3). P. e107–e109.
8. Whit Athey’s Haplogroup Predictor [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.hprg.com/hapest6/hapest6G2a/hapest6.htm?order=orig>, свободный. Загл. с экрана.
9. “Winperi”, компьютерная программа. J.H. Abramson, August 16, 2016. Version 11.65.
10. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на русской равнине. М.: ООО “Луч”, 2007. 416 с.
11. Карта географического распространения гаплогрупп Y-хромосомы на территории Евразии. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pp.vk.me/bu05HtNeimUcGTLgwGE0Asv1Z0XawlcEtYHg/n1BfaaxxKUQ.jpg>, свободный. Загл. с экрана.
12. Гаплогруппы коренных древних европейцев, гаплогруппа I, I1 и I2 у народов Европы. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://haplogroup.narod.ru/ineurope.html>, свободный. Загл. с экрана.
13. Ближневосточные гаплогруппы J1, J2, E1b1b1, G2a, T и др. Описание и связь с археологическими культурами. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://haplogroup.narod.ru/eur_hap2.html, свободный. Загл. с экрана.
14. Гаплогруппа J2. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://ru-wiki.ru/wiki/Гаплогруппа_J2, свободный. Загл. с экрана.
15. Гаплогруппа J1. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Гаплогруппа_J1_\(Y-ДНК\)](https://ru.wikipedia.org/wiki/Гаплогруппа_J1_(Y-ДНК)), свободный. Загл. с экрана.
16. Гаплогруппа G (Y-ДНК). Материал из Википедии – свободной энциклопедии. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Гаплогруппа_G_\(Y-ДНК\)](https://ru.wikipedia.org/wiki/Гаплогруппа_G_(Y-ДНК)), свободный. Загл. с экрана.
17. Гаплогруппа C* (xС3) (rps 4 у (m 130)). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://userdocs.ru/kultura/11205/index.html>, свободный. Загл. с экрана.
18. Гаплогруппа G. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://haplogroup.narod.ru/hapg.html>, свободный. Загл. с экрана.
19. Гаплогруппа H (Y-ДНК). [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://wikiredia.ru/wiki/Гаплогруппа_H, свободный. Загл. с экрана.
20. Гаплогруппа L (Y-ДНК). [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Гаплогруппа_L_\(Y-ДНК\)](https://ru.wikipedia.org/wiki/Гаплогруппа_L_(Y-ДНК)), свободный. Загл. с экрана.
21. Гаплогруппа O (Y-ДНК). [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Гаплогруппа_O_\(Y-ДНК\)#/](https://ru.wikipedia.org/wiki/Гаплогруппа_O_(Y-ДНК)#/), свободный. Загл. с экрана.
22. Гаплогруппа Q (Y-ДНК). [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://encyclopaedia.bid/википедия/Гаплогруппа_Q_\(Y-ДНК\)](https://encyclopaedia.bid/википедия/Гаплогруппа_Q_(Y-ДНК)), свободный. Загл. с экрана.
23. Пыбовский И.С., Веремейчик В.М., Котова С.А. и др. Создание судебной референтной базы данных по 18 аутосомным STR для ДНК-идентификации в Республике Беларусь // Генетика. 2017. № 2. С. 249–258. <https://doi.org/10.7868/S0016675817020138>

Frequencies of Y-Chromosome Haplogroups and Migration Processes in Three Generations of Moscow Residents

I. G. Udina^{a, *}, A. S. Gracheva^a, and O. L. Kurbatova^a

^a*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: irina_udina@mail.ru*

In three samples from the Moscow population, representing three conditional generations, genotyping was carried out for 18 STR of the Y-chromosome and data on genetic demography were collected by means of a questionnaire. Comparative statistical analysis revealed spectra and frequency profiles of Y-chromosome haplogroups characteristic for each generation; demonstrated significant differences between the two older generations and the younger generation of Moscow residents, in particular, in the frequency of haplogroup N. Statistically significant accumulation in the young generation of haplogroups of “southern origin” brought with the flows of migrants is shown. Features of the Y-chromosome haplogroup frequency distribution in three generations of Muscovites are in good agreement with the parameters of migration flows to Moscow in recent decades and with survey data on the places of origin of migrants and their ethnic composition. The results of the study indicate the need for timely updating and actualization of population reference databases for the purposes of DNA-based identification in megacities, as well as the need to supplement molecular genetic analysis with data on genetic demography obtained by questioning.

Keywords: Moscow, population, gene pool, Y-chromosome haplogroups, migration processes, generations.

ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ В ЛЕЙКОЦИТАХ
КРОВИ ОБЛУЧЕННЫХ ЛИЦ – ИТОГИ ИССЛЕДОВАНИЙ© 2022 г. Н. С. Кузьмина^{1, 2, *}, Н. Ш. Лаптева¹, А. В. Рубанович¹¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия²Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: nin-kuzmin@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.04.2022 г.

После доработки 20.05.2022 г.

Принята к публикации 24.05.2022 г.

С помощью метода метилчувствительной ПЦР проведено изучение гиперметилического CpG-островков промоторов четырех генов (*p53*, *ATM*, *SOD3*, *ESR1*) в лейкоцитах крови облученных лиц (100 чел.: ликвидаторы аварии на ЧАЭС, профессионалы-атомщики г. Сарова, жители территорий с радионуклидными загрязнениями) и у 140 человек контрольной группы. Полученные данные существенно дополнили и позволили подытожить результаты по изучению на протяжении нескольких лет радиационно-индуцированного гиперметилического промоторов генов в различных контингентах лиц, подвергшихся хроническому или фракционированному облучению в широком диапазоне доз. Показана дифференциальная значимость возраста и радиационного воздействия в метилировании CpG-островков промоторов разных генов, что демонстрируют однонаправленные эффекты, наблюдаемые в независимых выборках облученных лиц. ROC-анализ показал высокую информативность рассмотрения выявляемых эпигенетических нарушений как биомаркеров перенесенного облучения (AUC = 0.846 ± 0.015, $p = 1.5E-48$). Гиперметилическое CpG-островков генов *RASSF1A* и *p14/ARF* зависит от возраста, а эпигенетическая модификация локусов *p16/INK4A* и *GSTP1* высоко значимо ассоциирована с радиационным воздействием, что верифицировано на двух тестовых выборках обследованных индивидов. Выявленный дозозависимый характер гиперметилического облученных генов косвенно подтверждается наличием положительной ассоциативной связи между уровнем аберраций хромосомного типа и частотой метилированных локусов ($r = 0.604$, $p = 2.3E-11$).

Ключевые слова: радиация, гиперметилическое, промотор гена, CpG-островок, лейкоциты человека, аберрации хромосом.

DOI: 10.31857/S0016675822110066

Многолетний мониторинг генетического статуса представителей облученных локальных популяций, участников ликвидации радиационных катастроф, лиц, подвергшихся радиационному воздействию в результате профессиональной деятельности, проводимый как нами, так и другими исследователями (анализ аберраций хромосом, разрывов ДНК, мутаций генов и мини-/микросателлитных локусов) свидетельствует о повышенном уровне соматического мутагенеза в ближайшие и отдаленные сроки после экспонирования [1–5]. Эпигенетические эффекты – новый аспект последствий радиационного воздействия на организм человека. Их изучение представляет собой не только фундаментальную проблему, связанную с оценкой закономерностей действия радиации и реальных рисков облучения в широком диапазоне доз, но и важно с точки зрения прикладных аспектов радиационной медицины. Исходя из последних достижений эпигенетики, изучение таких локус-специфических изме-

нений метилирования ДНК как гиперметилическое промоторов ряда генов в нормальных лейкоцитах облученного человека представляется крайне важным и актуальным. Эти биомаркеры отдаленного радиационного воздействия могли бы иметь очевидную прогностическую ценность в отношении здоровья облученного индивида [6].

Ранее нами были впервые исследованы эпигенетические изменения четырех локусов (*RASSF1A*, *p16/INK4A*, *p14/ARF*, *GSTP1*) в двух независимых выборках облученных лиц и показана значимость радиационного фактора в индукции гиперметилического CpG-островков промоторов ряда генов в лейкоцитах крови, выявляемого в отдаленные сроки после перенесенного облучения [7, 8]. Очевидно, что для оценки прогностического потенциала выявляемых отдаленных эпигенетических нарушений как маркеров радиационного воздействия требуется расширение спектра исследуемых генов с охватом различных контингентов облучен-

ных лиц. Для решения этой проблемы также требуется проанализировать связь рассматриваемых модификаций с поврежденностью генома, регистрируемой в виде цитогенетических нарушений — аббераций хромосомного типа, характерных преимущественно для радиационного воздействия при отсутствии явных доказательств их сопряженности с индукцией тех или иных патологий [6]. В рамках предыдущих работ нами уже было изучено гиперметилование промоторов восьми генов в лейкоцитах крови сотрудников реакторного и радиохимического производств, подвергшихся пролонгированному внешнему воздействию γ -излучения или сочетанному внешнему (γ -лучи)/внутреннему (α -частицы) облучению [8–10].

В настоящей работе продолжено изучение гиперметилования промоторов генов клеточного цикла (*p53*, *ATM*), антиоксидантной защиты (*SOD3*), эстрогенового рецептора (*ESR1*) в лейкоцитах крови различных контингентов облученных лиц (ликвидаторы аварии на Чернобыльской АЭС, профессионалы-атомщики г. Сарова, жители территорий с радионуклидными загрязнениями). Полученные результаты существенно дополнили и позволили нам проанализировать совокупность полученных на протяжении нескольких лет данных по выявленным эпигенетическим модификациям в зависимости от дозы, интенсивности воздействующего излучения, возраста и цитогенетического статуса индивида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть данной работы включала в себя обследование 100 облученных лиц (ликвидаторы аварии на Чернобыльской АЭС, профессионалы-атомщики г. Сарова, жители территорий с радионуклидными загрязнениями) и 140 человек контрольной группы. Подробная характеристика облученных лиц этих групп представлена в нашей более ранней публикации [7].

Помимо смешанной выборки лиц, куда вошли вышеперечисленные контингенты, мы обследовали также 149 работников (от 52 до 86 лет) реакторного и радиохимического производств ПО “Маяк” (г. Озерск), подвергшихся пролонгированному внешнему воздействию γ -излучения и сочетанному внешнему (γ -лучи)/внутреннему (α -частицы, инкорпорированный ^{239}Pu) облучению и представляющих собой однородные группы лиц, имеющих продолжительный стаж работы в условиях одного завода. Контрольная группа включала биологический материал необлученных лиц — жителей г. Озерска, соответствующих по всем общепринятым показателям облученной группе (50 чел.). Уникальный банк ДНК работников ПО “Маяк” создан в клиническом отделе Южно-уральского института биофизики ФМБА России (г. Озерск). К моменту взятия образцов перифе-

рической крови дозы воздействия γ - и α -излучений на ККМ (красный костный мозг) составили соответственно от 142 до 2950 мГр и от 0 до 68 мГр. Характеристики этой когорты детально были изложены в наших предыдущих публикациях, где также частично представлены результаты ее обследования [8–10]. Здесь же приводятся обобщенные результаты эпигенетического анализа и их сравнение с таковыми, полученными для других групп облученных лиц.

В итоге общая численность обследованной выборки составила 605 человек (2.5–84 года), из них 273 облученных человека (36–84 года; ликвидаторы аварии на ЧАЭС, профессионалы-атомщики г. Сарова, жители территорий с радионуклидными загрязнениями, работники ПО “Маяк” г. Озерска). Следует подчеркнуть, что для большинства обследованных лиц промежуток времени между окончанием работы в условиях радиационного воздействия и взятием крови находился в диапазоне от нескольких месяцев до 61 года (в среднем 15.74 ± 1.04 лет). Если для работников атомной промышленности дозы облучения были рассчитаны и документированы, то для остальных контингентов облученных лиц такая информация отсутствовала.

Анализ гиперметилования CpG-островков промоторов генов клеточного цикла (*p53*, *ATM*), антиоксидантной защиты (*SOD3*), эстрогенового рецептора (*ESR1*) выполнен с применением детально описанной ранее оптимизированной и стандартизированной в лаборатории метилчувствительной полимеразной цепной реакции (МЧ-ПЦР), позволяющей диагностировать 0.1–1% метилированных аллелей в образце ДНК лейкоцитов крови [7, 8]. Вкратце реакцию метилчувствительной ферментативной рестрикции проводили с использованием эндонуклеазы *AciI* (Fermentas, Литва), которая гидролизует только неметилованные участки узнавания (5'...C↓C GC...3'). Доля проанализированных CpG-динуклеотидов составила 25, 12.2, 17.1, 8.3% для исследованных фрагментов промоторов генов *p53*, *ATM*, *SOD3*, *ESR1* соответственно. Образцы ДНК до и после гидролиза использовали в качестве матрицы для амплификации фрагментов промоторов кандидатных генов. Результаты каждого анализа были воспроизведены в трех независимых экспериментах.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программ WINPEPI (PEPI-for-Windows) и SPSS 20.0.0 общепринятыми статистическими методами. Значимость различий между группами оценивалась с помощью точного критерия Фишера с проведением коррекции *p*-значений на множественность сравнений (False Discovery Rate, FDR). Корреляционный и регрессионный (множественная регрессия, логистическая регрессия) анализы были использованы с

Таблица 1. Результаты изучения гиперметилирования промоторов генов в совокупной выборке обследованных лиц

Ген	Отсутствие (0)/наличие метилирования (1)	Контроль	Облученные	OR	p*	FDR**
<i>RASSF1A</i>	0	322	250	1.56	0.198	0.198
	1	10	23			
<i>p16/INK4A</i>	0	328	234	13.67	1.5E-9	2.1E-8
	1	4	39			
<i>p14/ARF</i>	0	321	249	2.81	0.005	0.007
	1	11	24			
<i>GSTP1</i>	0	330	243	20.37	5.2E-9	2.1E-8
	1	2	30			
<i>p53</i>	0	169	211	3.04	0.002	0.003
	1	10	38			
<i>ATM</i>	0	174	219	4.77	5.1E-4	0.001
	1	5	30			
<i>ESR1</i>	0	167	212	2.43	0.009	0.010
	1	12	37			
<i>SOD3</i>	0	158	162	4.04	3.9E-8	1.0E-7
	1	21	87			

* Точный двусторонний тест Фишера.

** Коррекция на множественность сравнений.

целью оценки зависимости между исследуемыми показателями (метилирование, возраст, радиационное воздействие и его доза). Адекватность полученных регрессионных моделей оценивалась с помощью ROC-анализа (анализ характеристической кривой), позволившего сделать выводы о прогностической эффективности совокупности рассматриваемых эпигенетических показателей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ ассоциаций в объединенной выборке обследованных лиц. Из таблицы сопряженности (2 × 2) радиационного воздействия и метилирования для совокупной выборки видно, что частоты облученных лиц с выявленными случаями метилирования промоторов всех проанализированных генов, кроме *RASSF1A*, статистически значимо превышали аналогичные показатели в контроле (табл. 1). Поскольку контрольная группа в данном исследовании включала лиц широкого возрастного диапазона (в том числе молодых людей 20–35 лет и детей 2.5–16 лет), для каждого гена была построена логистическая регрессия вида: метилирование ~ Возраст + Статус облучения (табл. 2). Видно, что метилирование генов *RASSF1A* и

p14/ARF зависит исключительно от возраста, в то время как эпигенетический статус *GSTP1*, *p53*, *ATM* и *ESR1* преимущественно сопряжен с перенесенным облучением. Метилирование остальных генов (*p16*, *SOD3*) зависит как от возраста, так и от радиационного воздействия.

Анализ ассоциаций с верификацией № 1. Для первой сформированной нами ранее смешанной выборки (ликвидаторы аварии на ЧАЭС, профессионалы-атомщики г. Сарова, жители территорий с радионуклидными загрязнениями) частоты случаев метилирования изученных генов, как правило, значимо превышали таковые показатели в соответствующем контроле (для *p14/ARF* $p = 0.074$) (табл. 3). Однако верификация данных на второй (тестовой) выборке (работники ПО «Маяк») хотя и показала такую же направленность выявляемых эффектов радиационного воздействия, тем не менее их уверенное воспроизведение отмечается только для генов *p16/INK4A*, *GSTP1* и *SOD3* (табл. 4).

Анализ ассоциаций с верификацией № 2. Если ранжировать всех обследованных нами лиц по наличию/отсутствию информации о дозе радиационного воздействия, значимые эффекты облучения, проходящие через поправку на множественность сравнений, выявлены для всех генов,

Таблица 2. Результаты оценки зависимости метилирования разных генов от возраста и радиационного воздействия (логистическая регрессия) в совокупной выборке обследованных лиц

Ген	Фактор	B^*	$SE(B)$	p^{**}	$Exp(B)$
<i>RASSF1A</i>	Возраст	0.044	0.013	0.001	1.045
	Статус	0.298	0.421	0.479	1.347
<i>p16/INK4A</i>	Возраст	0.035	0.013	0.008	1.036
	Статус	1.956	0.559	4.7E-4	7.069
<i>p14/ARF</i>	Возраст	0.066	0.016	2.4E-5	1.068
	Статус	0.040	0.400	0.920	1.041
<i>GSTP1</i>	Возраст	0.008	0.014	0.537	1.007
	Статус	2.816	0.794	3.9E-4	15.719
<i>p53</i>	Возраст	0.020	0.011	0.066	1.022
	Статус	0.850	0.387	0.028	2.341
<i>ATM</i>	Возраст	0.010	0.012	0.400	1.010
	Статус	1.409	0.519	0.007	4.092
<i>ESR1</i>	Возраст	0.010	0.010	0.299	1.010
	Статус	0.737	0.371	0.047	2.090
<i>SOD3</i>	Возраст	0.022	0.008	0.005	1.022
	Статус	1.114	0.280	7.0E-5	3.046

* Коэффициент в логистической регрессии.

** Тест Вальда.

Таблица 3. Результаты изучения гиперметилирования промоторов генов в смешанной выборке обследованных лиц (выборка открытия)

Ген	Отсутствие (0)/наличие метилирования (1)	Контроль	Облученные	OR	p^*	FDR^{**}
<i>RASSF1A</i>	0	274	114	5.71	4.7E-5	1.8E-4
	1	8	10			
<i>p16/INK4A</i>	0	281	112	30.11	4.3E-6	3.4E-5
	1	1	12			
<i>p14/ARF</i>	0	278	118	3.53	0.074	0.074
	1	4	6			
<i>GSTP1</i>	0	280	113	13.63	6.7E-5	1.8E-4
	1	2	11			
<i>p53</i>	0	122	86	2.84	0.036	0.041
	1	7	14			
<i>ATM</i>	0	125	85	7.21	2.5E-4	5.0E-4
	1	4	15			
<i>ESR1</i>	0	121	82	3.32	0.006	0.008
	1	8	18			
<i>SOD3</i>	0	117	73	3.61	0.001	0.002
	1	12	27			

* Точный двусторонний тест Фишера.

** Коррекция на множественность сравнений.

Таблица 4. Результаты изучения гиперметилирования промоторов генов в выборке работников ПО “Маяк” (тестовая выборка)

Ген	Отсутствие (0)/наличие метилирования (1)	Контроль	Облученные	OR	p*
<i>RASSF1A</i>	0	48	136	2.29	0.365
	1	2	13		
<i>p16/INK4A</i>	0	47	122	3.47	0.041
	1	3	27		
<i>p14/ARF</i>	0	43	131	0.84	0.806
	1	7	18		
<i>GSTP1</i>	0	50	130	15.09**	0.004
	1	0	19		
<i>p53</i>	0	47	125	3.01	0.094
	1	3	24		
<i>ATM</i>	0	49	134	5.49	0.078
	1	1	15		
<i>ESR1</i>	0	46	130	1.68	0.451
	1	4	19		
<i>SOD3</i>	0	41	89	3.07	0.006
	1	9	60		

* Точный двусторонний тест Фишера.

** OR вычислен с прибавлением 0.5 к каждой ячейке таблицы 2 × 2 (байесовская оценка).

кроме *p14/ARF*, только у работников атомной промышленности (выборка открытия: атомщики г. Сарова и работники ПО “Маяк”) с рассчитанной и документированной дозой облучения (табл. 5). В другой же обследованной группе индивидов (тестовая выборка: ликвидаторы аварии на ЧАЭС и жители территорий с радионуклидными загрязнениями) уверенное воспроизведение эффектов облучения отмечается только для генов *p16/INK4A* и *GSTP1* (табл. 6).

Эффективность выявления облученных лиц. Анализ параметров модели логистической регрессии, построенной на выборке лиц с документированной информацией о величине дозы облучения (выборка открытия), свидетельствует о высокой сопряженности метилирования с перенесенным радиационным воздействием: $p = 4.2E-32$, Найджелкерк $R^2 = 0.595$, доля правильных прогнозов 81.3%. Константа, а также коэффициенты логистической регрессии при предикторах (переменных) возраст и частота метилированных генов (отношение числа метилированных генов к общему числу проанализированных локусов) составили соответственно -5.569 , 0.085 и 6.112 .

В табл. 7 представлены исходные данные по трем выборкам обследованных лиц (выборка открытия, тестовая выборка, совокупная выборка), а именно частоты истинно облученных лиц, что было подтверждено (ТР – “true positive”, ИП – истинно положительные результаты) или, наоборот, не доказано (FN – “false negative”, ЛО – ложноотрицательные результаты) рассматриваемым эпигенетическим методом, и частоты истинно необлученных лиц, результаты обследования которых классифицируются как ложноположительные, ЛП (FP – “false positive”) и истинно отрицательные, ИО (TN – “true negative”). На основании этих данных были рассчитаны основные характеристики применяемого теста, основанного на анализе гиперметилирования генов: чувствительность, т.е. способность выявлять (“видеть”) облученных лиц, и специфичность, т.е. способность не принимать необлученных людей за облученных.

Как видно, чувствительность эпигенетического теста, определенная по выборке открытия, достигает высоких значений (90%), но была наименьшей (29.1%) при обследовании тестовой выборки индивидов. Специфичность, напротив, имеет более высокие значения в группе лиц с недокумен-

Таблица 5. Результаты изучения гиперметилирования промоторов генов в выборке лиц с документированной дозой облучения (выборка открытия)*

Ген	Отсутствие (0)/наличие метилирования (1)	Контроль	Облученные	OR	p^{**}	FDR***
RASSF1A	0	143	154	4.95	0.008	0.011
	1	3	16			
p16/INK4A	0	143	141	9.08	6.7E-6	1.8E-5
	1	3	29			
p14/ARF	0	138	152	2.04	0.106	0.106
	1	8	18			
GSTP1	0	146	150	39.9****	2.5E-6	1.0E-5
	1	0	20			
p53	0	114	138	5.16	0.001	0.002
	1	4	25			
ATM	0	116	144	7.65	0.001	0.002
	1	2	19			
ESR1	0	112	139	3.22	0.011	0.013
	1	6	24			
SOD3	0	106	100	5.57	5.5E-8	4.4E-7
	1	12	83			

* Облученные лица (профессионалы-атомщики г. Сарова, работники ПО “Маяк”) и необлученные лица (курсанты Военно-технического университета Министерства обороны Российской Федерации, жители г. Сарова).

** Точный двусторонний тест Фишера.

*** Коррекция на множественность сравнений.

**** OR вычислен с прибавлением 0.5 к каждой ячейке таблицы 2×2 (байесовская оценка).

тированной дозой облучения (84% против 68.5% для выборки открытия). ROC-анализ показал хорошую/очень хорошую прогностическую силу рассмотрения гиперметилирования генов как биомаркеров перенесенного облучения: площадь под ROC-кривой $AUC = 0.879 \pm 0.020$, $p = 2.9E-31$ и $AUC = 0.744 \pm 0.028$, $p = 6.0E-12$ для выборки открытия и тестовой выборки соответственно. Общая доля корректных прогнозов была наибольшей в выборке открытия (80.1% против 64.4% для тестовой выборки). На рис. 1 представлены ROC-кривые, построенные для выборки открытия и тестовой выборки.

В табл. 7 и на рис. 1 представлены результаты ROC-анализа, выполненного для объединенной выборки обследованных лиц, которые свидетельствуют о значимой сопряженности статуса “облученный” с метилированием проанализированных генов: $AUC = 0.846 \pm 0.015$, $p = 1.5E-48$. Таким образом, мы наблюдаем очень хорошую прогностическую эффективность рассмотрения гиперметилирования генов как отдаленных биомаркеров радиационного воздействия. При этом значения

чувствительности, специфичности и доли корректных прогнозов были примерно одинаковы и составили более 70%.

Зависимость гиперметилирования генов от дозы облучения. Зависимость частоты метилированных генов у работников атомной промышленности от дозы внешнего воздействия γ -излучения адекватно характеризует непараметрическая корреляция по Спирмену: $r = 0.458$, $p = 1.8E-16$ (по Пирсону $r = 0.372$, $p = 5.4E-11$). Рис. 2 наглядно демонстрирует наблюдаемую сопряженность. Однако в нее значительный вклад дает возрастная зависимость метилирования.

Частная корреляция дозы и числа метилированных локусов (на один ген) при фиксированном возрасте равна $r = 0.200$, $p = 0.001$. Множественная регрессия вида: частота метилированных генов \sim возраст + доза характеризуется $R^2 = 0.211$, $p = 1.4E-15$. Регрессионные коэффициенты модели для дозы и возраста соответственно равны: $\beta = 0.211$, $p = 0.001$ и $\beta = 0.314$, $p = 4.6E-7$.

Таблица 6. Результаты изучения гиперметилирования промоторов генов в выборке лиц с неопределенной дозой облучения (тестовая выборка)*

Ген	Отсутствие (0)/наличие метилирования (1)	Контроль	Облученные	OR	p**
RASSF1A	0	179	96	1.86	0.264
	1	7	7		
p16/INK4A	0	185	93	19.89	1.9E-4
	1	1	10		
p14/ARF	0	183	97	3.77	0.073
	1	3	6		
GSTP1	0	184	93	9.89	7.9E-4
	1	2	10		
p53	0	55	73	1.63	0.456
	1	6	13		
ATM	0	58	75	2.84	0.155
	1	3	11		
ESR1	0	55	73	1.63	0.456
	1	6	13		
SOD3	0	52	62	2.24	0.072
	1	9	24		

* Облученные лица (ликвидаторы аварии на ЧАЭС, жители территорий с радионуклидными загрязнениями) и необлученные лица (жители “чистых” территорий).

** Точный двусторонний тест Фишера.

Сопряженность между гиперметилированием промоторов генов и цитогенетическими показателями. Результаты оценки у части индивидов (101 чел.: ликвидаторы аварии на ЧАЭС, взрослые жители территорий с радионуклидными загрязнениями)

гиперметилирования промоторов восьми вышеперечисленных генов в зависимости от цитогенетического статуса показали следующее. Так как распределения обследованных лиц по частотам метилированных генов и aberrаций хромосом не имели

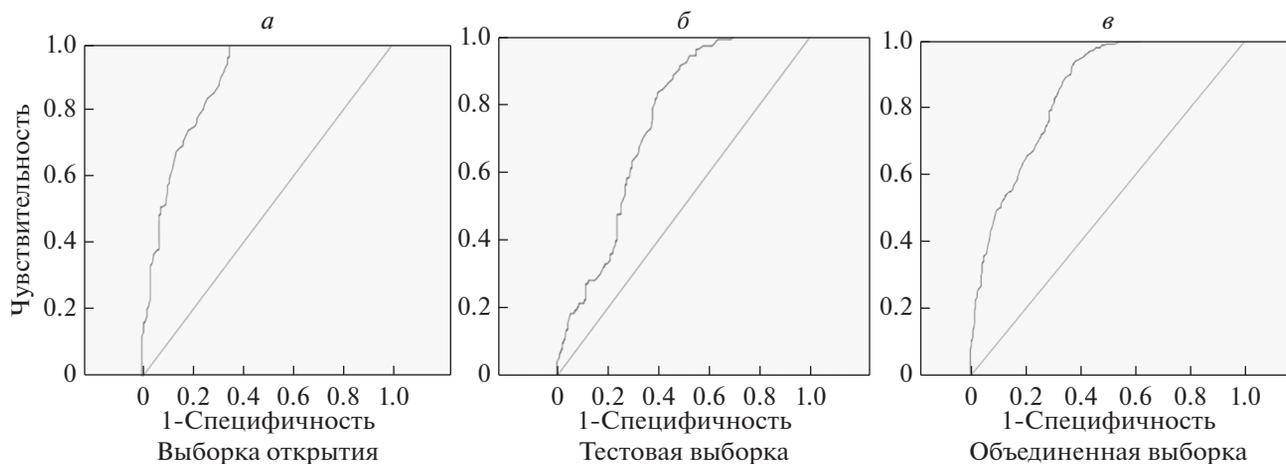


Рис. 1. Прогностическая эффективность рассмотрения гиперметилирования генов как отдаленных биомаркеров радиационного воздействия (ROC-анализ).

Таблица 7. Классификация исходных данных* и квалификационные характеристики эпигенетического теста

Выборка	Наблюдаемый (фактический) статус		Предсказанный статус (на основании результатов исследований)			
			статус		процент корректных прогнозов	
			0	1		
Выборка открытия	Статус	0	100	46	Специфичность	68.5
		1	17	153	Чувствительность	90
	Общий процент корректных прогнозов**				80.1	
Тестовая	Статус	0	156	30	Специфичность	83.9
		1	73	30	Чувствительность	29.1
	Общий процент корректных прогнозов**				64.4	
Объединенная	Статус	0	247	85	Специфичность	74.4
		1	77	196	Чувствительность	71.8
	Общий процент корректных прогнозов**				73.2	

* В четырехпольной таблице в соответствующих ячейках представлено количество лиц следующих групп:

	0	1
0	ИО (TN)	ЛП (FP)
1	ЛО (FN)	ИП (TP)

** Рассчитывается как отношение числа лиц с подтвержденным в результате проведенных исследований статусом (TN + TP) к общему числу обследованных (TN + FN + FP + TP).

нормального характера, были вычислены соответствующие ранговые корреляции по Спирмену. Наблюдается положительная значимая сопряженность между суммарным уровнем нарушений хромосомного типа и метилированием локусов ($r = 0.604$, $p = 2.3E-11$). В частности, только для дицентриков и колец – объективных маркеров радиационного воздействия такая ассоциативная связь характеризуется следующими показателями: $r = 0.441$, $p = 3.9E-6$. В то же время рассматриваемая сопряженность для aberrаций хроматидного типа отсутствовала ($r = 0.074$, $p = 0.460$). Визуально сопряженность нарушений метилирования с общей частотой aberrаций хромосомного типа (по Пирсону $r = 0.572$, $p = 4.3E-10$) представлена на рис. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Подводя итог многолетнему мониторингу популяций человека, проводимому лабораторией экологической генетики на протяжении десятилетий, спустя годы и десятки лет после перенесенного радиационного воздействия наблюдаются не только выраженная поврежденность генома соматических и половых клеток облученных лиц, но и эпигенетические нарушения. Последнее до-

казывают полученные нами данные, изложенные в настоящей статье. ROC-анализ показал высокую информативность рассмотрения выявляемых эпигенетических нарушений как биомаркеров перенесенного облучения. Гиперметилирование CpG-островков генов *RASSF1A* и *p14/ARF* зависит от возраста, а эпигенетическая модификация локусов *p16/INK4A* и *GSTP1* высокозначимо ассоциирована с радиационным воздействием, что верифицировано на двух тестовых выборках обследованных индивидов.

Воспроизводимость значимых эффектов облучения только для части генов при верификации данных на второй тестовой выборке работников ПО “Маяк” (первый способ ранжирования обследованных лиц) при сохранении направленности выявляемых эффектов радиационного воздействия (табл. 3, 4), вероятно, объясняется более молодым возрастом обследованных лиц первой группы, характеризующихся большей чувствительностью к облучению.

В то же время при втором способе ранжирования индивидов значимые эффекты облучения выявляются для семи из восьми изученных генов у работников атомной промышленности. При этом в тестовой выборке ликвидаторов аварии на ЧАЭС и жителей территорий с радионуклидными

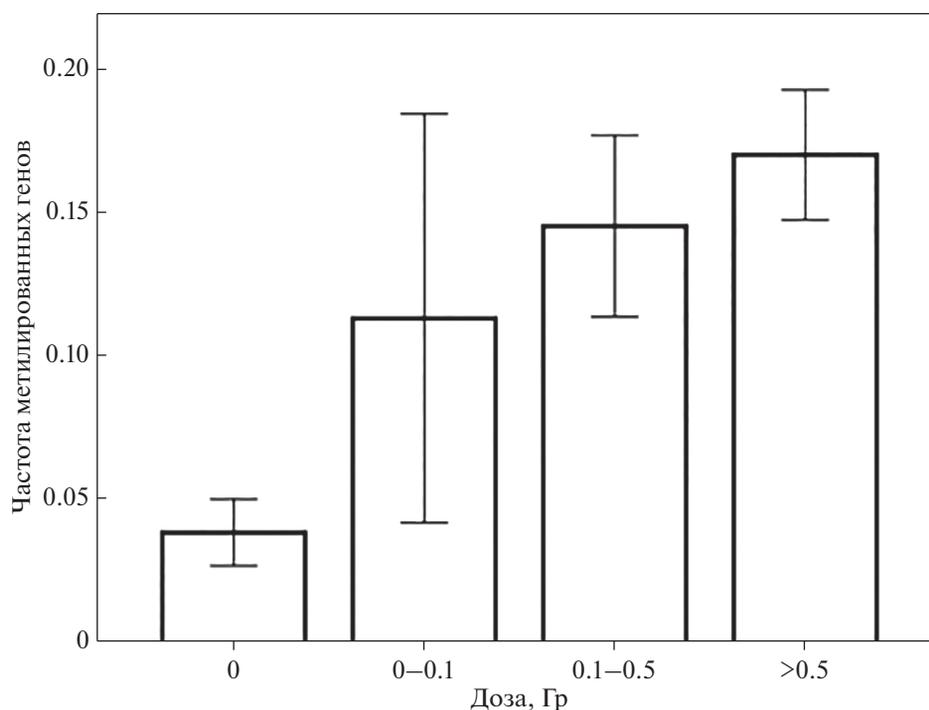


Рис. 2. Зависимость средней частоты метилированных генов от дозы внешнего воздействия γ -излучения. Указаны 95%-ные доверительные интервалы.

загрязнениями воспроизведение эффектов облучения отмечается только для генов *p16/INK4A* и *GSTP1* (табл. 5, 6). Вероятно, это связано с гораздо более молодым возрастом обследованных лиц контрольной группы в первом исследовании (20-летние курсанты Военно-технического университета) по сравнению с работниками атомной промышленности (52–86 лет). В то же время часть облученных и необлученных лиц тестовой выборки имела противоположные возрастные характеристики по сравнению с обследованными индивидами выборки открытия. Поэтому, несмотря на выявленное отсутствие зависимости метилирования ряда генов от возраста индивидов (табл. 2), накопление в течение жизни стохастических эффектов — эпигенетических модификаций, представляющих собой совокупные эффекты воздействия множества экзогенных факторов, вероятно и является объяснением полученных результатов. Тем не менее статус метилирования генов *p16/INK4A* и *GSTP1* однозначно более “уязвим” к действию факторов радиационной природы.

Вышеприведенное объяснение можно применить и в отношении низкой чувствительности рассматриваемого эпигенетического теста, оцененной для тестовой выборки индивидов, при высоких значениях этого показателя в выборке открытия (второй способ ранжирования обследованных лиц) (табл. 7, рис. 3). Необходимо учитывать и более низкие уровни облучения первой ко-

горты, в которую вошли не только ликвидаторы аварии на ЧАЭС, но и жители территорий с радионуклидными загрязнениями. Для последних характерно радиационное воздействие в суммарных дозах, в среднем превышающих в 2–2.5 раза таковые от естественного радиационного фона. Именно при таком облучении проявляются обусловленные генетическим полиморфизмом наибольшая гетерогенность человеческой популяции по индивидуальной радиочувствительности и феномен гиперчувствительности, связанный с наличием пороговой дозы радиации для активации клеточных защитных механизмов [11].

Наблюдаемая сопряженность между генетическими (абберации хромосомного типа) и эпигенетическими показателями, по нашему мнению, вполне согласуется с предполагаемыми механизмами индукции гиперметилирования генов под действием радиации (сверхрегуляция ДНК метилтрансфераз активными формами кислорода, рекрутирование этих ферментов к специфическим сайтам репарации ДНК) и ранее подробно рассмотренной общностью причин сохранения индуцированных нарушений генома и эпигенома. Они могут быть связаны не только с непосредственным действием квантов радиации/ионизирующих частиц на клетки крови и их стволовые гемопоэтические предшественники, но и с немощными отсроченными эффектами облучения,

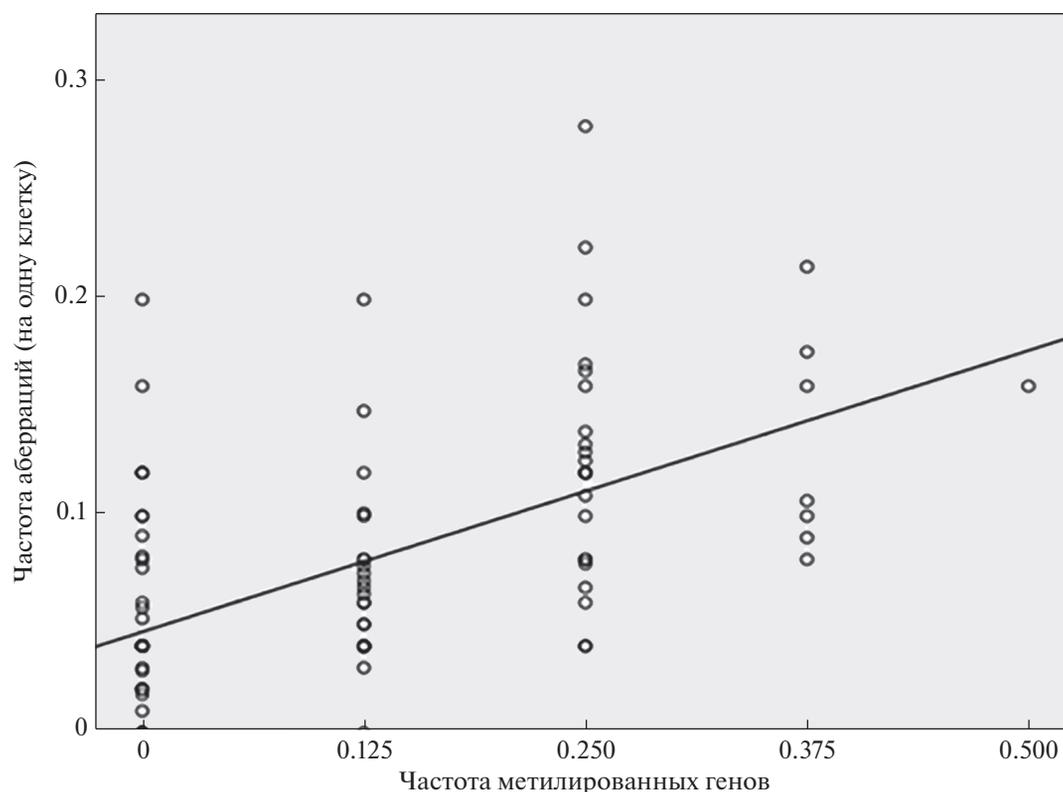


Рис. 3. Зависимость уровня aberrаций хромосомного типа от частоты метилированных генов у облученных лиц.

такими как радиационно-индуцированные геномная нестабильность и эффект “свидетеля” [7–10].

Предполагается важная роль механизмов хронического оксидативного стресса в реализации “байстэндер” эффектов. Выявлены значимо повышенные уровни ДНК-метилтрансфераз и маркеров оксидативного стресса – 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина (8-OHdG) и 4-гидроксиноненала (4-HNE, продукт липидной пероксидации), которые были сопряжены с дозовой нагрузкой у врачей, подвергшихся многолетнему низкоинтенсивному облучению в результате профессиональной деятельности. Уровень 8-OHdG отрицательно коррелировал с тотальным метилированием генома и положительно – с концентрацией гомоцистеина (продукт трансметилирования метионина) в сыворотке крови [12]. В других исследованиях показана обратная сопряженность между общим уровнем метилирования ДНК/метилированием *LINE-1* повтора и хромосомными нарушениями (частота aberrаций хромосомного типа, анеуплоидий) [13, 14].

Индукция гиперметилирования генов и реальность сохранения этих эпигенетических эффектов в отдаленный период после воздействия ионизирующих излучений показаны в нескольких работах на животных, что обсуждалось нами ранее [6–10]. Имеются единичные исследования радиационно-

но-индуцированных нарушений метилома и у растений, в том числе выполненные на природных популяциях. Так, повышение общего уровня метилирования генома в результате хронического воздействием радиации в малых дозах показано при исследовании сосны и сои, произрастающих на территориях, загрязненных радионуклидами в результате аварии на ЧАЭС (территории вблизи Чернобыльской АЭС, Брянская и Гомельская обл.) [15, 16]. Наблюдаемые в популяциях растений эпигенетические изменения были подтверждены в недавнем экспериментальном исследовании по изучению влияния радиации на метилирование ДНК у растений трех поколений [17]. Так, 7-дневные растения *Arabidopsis thaliana* подвергались воздействию γ -излучения (30 и 110 мГр/ч) либо естественному фоновому излучению в течение 14 дней. Если родительское поколение состояло из ранее неэкспонированных растений, то особи поколений 1 и 2 – потомки облученных родителей. Выраженное увеличение числа дифференциально-метилированных регионов (ДМР) наблюдалось у представителей всех трех поколений, подвергшихся воздействию радиации с низкой мощностью дозы, причем во второй генерации рассматриваемые изменения были наиболее выражены. При этом значимые эпигенетические эффекты воздействия облучения с высокой мощностью дозы не выявлены. Большинство ДМР, ассоциирован-

ных с транспозонами, были гиперметилированы. Гены, характеризующиеся измененным эпигенетическим статусом, ассоциированы с развитием, различными стрессовыми реакциями, включая репарацию ДНК и сплайсинг РНК. По мнению авторов, полученные результаты могут указывать на роль метилирования ДНК в регуляции этих генов в ответ на воздействие радиации и обеспечивают адаптацию растений в течение нескольких поколений [17]. Повышение тотального уровня метилирования генома как защитного механизма при воздействии низкоинтенсивной радиации отмечалось и обсуждалось также другими исследователями [6].

Очевидно, что наблюдаемое нами в отдаленный период после экспонирования дозозависимое гиперметилирование отдельных CpG-динуклеотидов CpG-островков промоторов ряда генов, затрагивающее малую фракцию клеточной популяции облученного организма и ассоциированное с цитогенетическими нарушениями, преимущественно является результатом повреждающего действия радиации на молекулы клетки (мишенное и немишенное эффекты облучения), а не индукцией генерализованных изменений метилирования ДНК как ответ клетки на облучение [10].

До недавнего времени исследования, подобные нашим работам, отсутствовали. Однако за последний год появились другие статьи, посвященные данной тематике. При обследовании 11 работников Сибирского химического комбината выявлена значимая ассоциация степени метилирования промоторов генов апоптоза *BAD*, *BID* и *HRK* с дозой γ -излучения. Уровень метилирования локуса *BCLAF1* сопряжен с возрастом обследованных лиц, но не с цитогенетическими показателями и дозой облучения [18]. Выявлена сопряженность степени метилирования генов *BAX* и *APAF1* с частотой аберрантных клеток и уровнем дицентриков соответственно. Этими же авторами не выявлено рассматриваемых эффектов облучения в отношении локуса *Bak1*. Тем не менее отмечается, что неметилированный промотор преимущественно встречается в подгруппе лиц с более высокой дозой нагрузки [19]. В другой работе [20] не выявлено отличий в статусе метилирования CpG-островков промоторных регионов генов *CDKN1A*, *BCL-2*, *ATM* у жителей прибрежных сел р. Течи с кумулятивной дозой на ККМ от 0.09 до 3.51 Гр (54 чел.) по сравнению с лицами с более низкой дозой нагрузки (14 чел., менее 70 мГр). В целом полученные этими коллективами данные, посвященные изучению эпигенетического статуса других генов клеточного цикла/апоптоза, согласуются со сделанными нами выводами о дифференциальной значимости возраста и облучения в метилировании CpG-островков промоторов разных генов.

Радиационно-индуцированное гиперметилирование клеток крови человека было выявлено и в эксперименте *in vitro*. Так, в облученных мононуклеарных клетках (0.1 Гр) показано возрастание уровня метилирования промоторов двух генов *MRE11A* и *TNF α* из 13 изученных (*PARP1*, *ATM*, *BRCA1*, *MLH1*, *XPC*, *RAD23B*, *APC*, *TNF α* , *DNMT3A*, *MRE11A*, *MGMT*, *CDKN2A*, *MTHFR*) через 72 ч пролиферации этих клеток в культуре. При радиационном воздействии в высокой дозе (2 Гр) спектр генов с этой эпигенетической модификацией расширился до пяти локусов *MRE11A*, *PARP1*, *BRCA1*, *DNMT3A* и *RAD23B*, а рассматриваемый эффект уже наблюдался через 48 ч культивирования [21].

Нарушения генома/эпигенома приводят к аккумуляции в облученном организме клеток с измененной пенетрантностью/экспрессивностью гено-/фенотипов. Уже экспериментально с использованием нескольких биологических объектов доказано, что генотоксиканты являются мощными индукторами ошибок транскрипции, а именно изменений транскриптома, затрагивающих все классы РНК-молекул, количество которых существенно превышает уровень регистрируемых реализованных в мутации повреждений ДНК [22]. Поэтому выявленный нами спектр нарушений генома/эпигенома является не только биоиндикатором воздействия радиации, но и может свидетельствовать о развитии функционального дисбаланса клеток организма, приводящего к преждевременному развитию мультифакториальной патологии и ее хронизации. В целом можно говорить об изменении качества жизни и снижении биологической устойчивости облученных индивидов и популяции в целом.

Реакция организма человека и популяции в целом на облучение происходит на фоне действия множества других факторов, что особенно следует учитывать для населения городов. С одной стороны, это резкое изменение генетической структуры популяции. В работах Ю.П. Алтухова и его сотрудников дается анализ популяционно-генетических процессов в городском населении, не соответствующих критериям нормы. Так, генофонд коренных граждан не воспроизводится в последующих поколениях, а внутривидовое генетическое разнообразие возрастает за счет совокупности ряда факторов: давление миграции, процессы аутбридинга, отчасти релаксация отбора, связанного с дифференциальной дорепродуктивной смертностью и дифференциальной плодовитостью. С другой стороны, ухудшение для большей части населения социально-экономических условий, нарастание психо-эмоционального стресса, резкое введение в окружающую среду множества генотоксикантов даже в малых концентрациях приводят к тому, что селективно-нейтральные генотипы оказываются селективно-значимыми,

происходит срыв адаптивных возможностей организма, разрушаются адаптивные комплексы генов, усиливаются темпы рекомбинационных/мутационных процессов [23, 24].

Дальнейшие исследования с использованием совокупности современных молекулярно-генетических методов необходимы как для оценки закономерностей мутагенеза/эпимутагенеза в облученных популяциях людей, так и для создания системы высокопрогностических превентивных маркеров развития отдаленной патологии, сопряженной с перенесенным радиационным воздействием.

Работа частично выполнена в рамках темы Государственного задания Минобрнауки России “Механизмы генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека” (№ 0092-2019-0007), подтемы “Эпигенетические эффекты воздействия мутагенов физической и химической природы на человека”.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шевченко В.А., Снигирева Г.П. Значимость цитогенетического обследования для оценки последствий Чернобыльской катастрофы // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 2. С. 133–139.
2. Шевченко В.А., Сусков И.И., Снигирева Г.П. и др. Генетический статус населения, подвергшегося воздействию ядерных испытаний // Вестник науч. программы “Семипалатинский полигон-Алтай”. 1994. № 3. С. 5–32.
3. Смирнова С.Г., Орлова Н.В., Крикунова Л.И. и др. Частота лимфоцитов с мутациями по локусу Т-клеточного рецептора у жителей радиационно загрязненных районов Брянской области спустя 28 лет после аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2016. Т. 56. № 3. С. 285–292. <https://doi.org/10.7868/S0869803116030164>
4. Пилинская М.А., Дыбский С.С., Шеметун Е.В., Дыбская Е.Б. Соматический хромосомный мутагенез у жителей Украины, пострадавших от действия ионизирующего излучения, в разные сроки после аварии на Чернобыльской АЭС // Вестник РАМН. 2011. № 9. С. 63–68.
5. Шайхаев Г.О., Кузьмина Н.С., Мязин А.Е. и др. Изучение частоты мутаций в мини- и микросателлитных локусах ДНК в клетках членов семей работников атомной промышленности, работавших с тритием и его окисью // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 6. С. 690–697.
6. Кузьмина Н.С. Радиационно-индуцированные нарушения метилирования ДНК: исследования *in vitro* и *in vivo* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. № 5. С. 481–506. <https://doi.org/10.31857/S0869803120050070>
7. Kuzmina N.S., Laptewa N.Sh., Rubanovich A.B. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure // Environ. Res. 2016. V. 146. P. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.008>
8. Kuzmina N.S., Laptewa N.Sh., Rusinova G.G. et al. Gene hypermethylation in blood leukocytes in humans long term after radiation exposure – validation set // Environ. Pollut. 2018. V. 234. P. 935–942. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.039>
9. Кузьмина Н.С., Лантева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др. Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся сочетанному воздействию гамма- и альфа-излучений // Генетика. 2018. Т. 54. № 13. Приложение. С. S22–S26. <https://doi.org/10.1134/S0016675818130118>
10. Kuzmina N.S., Laptewa N.Sh., Rusinova G.G. et al. Dose dependence of hypermethylation of gene promoters in blood leukocytes in humans occupationally exposed to external gamma radiation // Biology Bulletin. 2019. V. 46. № 11. P. 1489–1495. <https://doi.org/10.1134/S1062359019110062>
11. Martin L.M., Marples B., Lynch T.H. et al. Exposure to low dose ionising radiation: Molecular and clinical consequences // Cancer Lett. 2013. V. 338. № 2. P. 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.021>
12. Chen B., Dai Q., Zhang Q. et al. The relationship among occupational irradiation, DNA methylation status, and oxidative damage in interventional physicians // Medicine (Baltimore). 2019. V. 98. № 39. e17373. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017373>
13. Lee Y., Kim Y.J., Choi Y.J. et al. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers // Int. J. Radiat. Biol. 2015. V. 91. № 2. P. 142–149. <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.969847>
14. Cho Y.H., Jang Y., Woo H.D. et al. LINE-1 hypomethylation is associated with radiation-induced genomic instability in industrial radiographers // Environ. Mol. Mutagen. 2018. V. 60. № 2. P. 174–184. <https://doi.org/10.1002/em.22237>
15. Georgieva M., Rashydov N.M., Hajdуч M. DNA damage, repair monitoring and epigenetic DNA methylation changes in seedlings of Chernobyl soybeans // DNA Repair. 2017. V. 50. P. 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.12.002>
16. Volkova P.Yu., Geras'kin S.A., Horemans N. et al. Chronic radiation exposure as an ecological factor: Hypermethylation and genetic differentiation in irradiated Scots pine populations // Environ. Pollut. 2018. V. 232. P. 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.123>

17. *Laanen P., Saenen E., Mysara M. et al.* Changes in DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* plants exposed over multiple generations to gamma radiation // *Front. Plant Sci.* 2021. № 12. P. 611783. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.611783>
18. *Исубакова Д.С., Цымбал О.С., Брониковская Е.В. и др.* Метилирование промоторов генов апоптоза в лимфоцитах крови работников, подвергавшихся в процессе профессиональной деятельности долговременному внешнему облучению // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2021. Т. 171. № 3. С. 339–343. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-171-3-339-343>
19. *Цымбал О.С., Исубакова Д.С., Брониковская Е.В. и др.* Роль метилирования *Bak1* в индукции хромосомных aberrаций при хроническом низкоинтенсивном внешнем облучении // *Мед. радиология и радиац. безопасность.* 2020. Т. 65. № 5. С. 29–34. <https://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-5-29-34>
20. *Блинова Е.А., Никифоров В.С., Янишевская М.А., Аклеев А.В.* Метилирование генов *BCL-2*, *CDKN1A* и *ATM* у лиц, подвергшихся хроническому облучению // *Медицина экстрем. ситуаций.* 2021. Т. 23. № 3. С. 11–15. <https://doi.org/10.47183/mes.2021.028>
21. *Priya R., Das B.* Global DNA methylation profile at LINE-1 repeats and promoter methylation of genes involved in DNA damage response and repair pathways in human peripheral blood mononuclear cells in response to γ -radiation // *Mol. Cell Biochem.* 2022. V. 477. № 1. P. 267–281. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04265-4>
22. *Fritsch C., Gout J.-F., Haroon S. et al.* Genome-wide surveillance of transcription errors in response to genotoxic stress // *PNAS.* 2021. V. 118. № 1. e2004077118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004077118>
23. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Алтухова Ю.П. М.: Наука. 2004. 619 с.
24. *Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю.* Городские популяции: возможности генетической демографии (миграция, подразделенность, аутбридинг) // *Вестник ВОГиС.* 2006. Т. 10. № 1. С. 155–188.

Hypermethylation of Gene Promoters in Blood Leukocytes of Irradiated Individuals – Final Research Results

N. S. Kuzmina^{a, b, *}, N. Sh. Lapteva^a, and A. V. Rubanovich^a

^a*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

^b*Semyonov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: nin-kuzmin@yandex.ru*

Hypermethylation of CpG islands in the promoter regions of 4 genes (*p53*, *ATM*, *SOD3*, *ESR1*) was studied in blood leukocytes of irradiated humans (100 subjects: Chernobyl Nuclear Power Plant clean-up workers, nuclear workers, residents of territories with radionuclide contamination) and 140 unirradiated subjects (control group) using methylation-sensitive polymerase chain reaction (PCR) assay. The obtained data significantly supplemented and allowed us to summarize results received over several years of the study of radiation-induced hypermethylation in the gene promoters in various contingents of individuals exposed to chronic or fractionated radiation in a wide range of doses. The differential significance of age and radiation exposure in methylation of CpG islands in promoter regions of different genes was revealed, which is demonstrated by unidirectional effects observed in independent samples of irradiated individuals. The ROC curve analysis showed a high prognostic potential of consideration of detected epigenetic disorders as biomarkers of radiation exposure (AUC = 0.846 ± 0.015, $p = 1.5E-48$). Hypermethylation of the CpG islands in *RASSF1A* and *p14/ARF* genes depends on age, and epigenetic modification of the *p16/INK4A* and *GSTP1* loci is highly significantly associated with radiation exposure, that was verified on two test samples of the examined individuals. The revealed dose-dependent hypermethylation of the studied genes is indirectly confirmed by positive associative relationship between the level of chromosomal aberrations and the frequency of methylated genes ($r = 0.604$, $p = 2.3E-11$).

Keywords: radiation, hypermethylation, gene promoters, CpG island, human leukocytes, chromosome aberrations.