

К ВОПРОСУ О СТАТУСЕ БЕЛОГО ГОЛЬЦА *SALVELINUS ALBUS* GLUBOKOVSKY, 1977 И ЕГО ИДЕНТИЧНОСТИ ИЗ РАЗНЫХ МЕСТ ОБИТАНИЯ¹

© 2016 г. Л. А. Животовский^{1,2}, Е. Г. Шайхаев^{1,3}, С. Д. Павлов⁴,
Е. А. Пивоваров⁴

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва 119991;

²Всероссийский НИИ рыболовства и океанографии, Москва 107140;

³Российский научный центр рентгенодиагностики Министерства здравоохранения России, Москва 117997;

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва 119234
e-mail: levazh@gmail.com

Статья принята к печати 24.09.2015 г.

Считается, что белый голец *Salvelinus albus* Glubokovsky, 1977, первично описанный из бассейна р. Камчатка, и белый голец из оз. Кроноцкое (п-в Камчатка) таксономически идентичны и представляют собой две репродуктивно изолированные популяции одного вида. Однако данные по их молекулярной дивергенции позволяют говорить о различиях более высокого, возможно, подвидового уровня, что предполагает необходимость глубоких комплексных исследований белого гольца и других близкородственных видов и форм гольцов.

Ключевые слова: белый голец, река Камчатка, озеро Кроноцкое, таксономический статус, ДНК-маркер.

On the status and identity of the white char, *Salvelinus albus* Glubokovsky, 1977, from different habitats.

L. A. Zhivotovskiy^{1,2}, E. G. Shaikhaev^{1,3}, S. D. Pavlov⁴, E. A. Pivovarov⁴ (N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow 119991; ²All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow 107140; ³Russian Scientific Center of Roentgen Radiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow 117997; ⁴Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119234)

The white char, *Salvelinus albus* Glubokovsky, 1977, originally described from the Kamchatka River basin, and the white char from Lake Kronotsky, Kamchatka Peninsula, are believed to be identical taxonomically and represent two reproductively isolated populations of the same species. However, the data on their molecular divergence show that they may differ at a higher, probably sub-species, level. This suggests the necessity of deeper, complex studies of white char and other closely related char species and forms. (*Biologiya Morya*, 2016, vol. 42, no. 2, pp. 159–161).

Keywords: white char, Kamchatka River, Lake Kronotsky, taxonomic status, DNA marker.

Гольцы – лососевые рыбы рода *Salvelinus* (Salmoniformes, Salmonidae) – широко распространены в водоемах Голарктики; среди них есть пресноводные (озерные, озерно-речные и речные) и анадромные формы. Для большинства гольцов характерны активные микроэволюционные процессы, обусловленные их высокой экологической пластичностью. Весьма разнообразны гольцы п-ва Камчатка, представленные рядом видов и форм на разных стадиях дивергенции, при этом таксономический статус некоторых из них продолжает оставаться дискуссионным (Глубоковский, 1977, 1995; Викторский, 1978; Савваитова, 1989; Черешнев и др., 2002; Олейник и др., 2010; Павлов и др., 2013; Сенчукова, 2014, и др.). Один из таких видов – это белый голец *Salvelinus albus* Glubokovsky, 1977, первично описанный из бассейна р. Камчатка. Позднее в результате таксономических ревизий он был объединен с белым гольцом из оз. Кроноцкое (Глубоковский, 1995; Черешнев и др., 2002). Другие исследователи полагают, что в обоих случаях можно говорить лишь о форме камчатской мальмы (Савваитова, 1970, 1989).

Олейник с соавторами (2010) на основании генетических данных пришли к выводу, что белые гольцы из р. Камчатка и оз. Кроноцкое сходны между собой на уровне

одного вида, но при этом весьма близки к проходной мальме, фактически образуя с ней один вид. В работе Сенчуковой (2014) показано генетическое сходство белого гольца из оз. Кроноцкое с другими эндемичными формами гольцов из оз. Кроноцкое, а также с проходной мальмой из р. Кроноцкая. По исследованным в работе Олейник с соавторами (2010) фрагментам митохондриальной ДНК (мтДНК) было выявлено небольшое несовпадение у данных локальностей белого гольца по числу нуклеотидных замещений. Однако в этом же исследовании было установлено, что у белых гольцов из р. Камчатка и оз. Кроноцкое полностью отсутствуют общие гаплотипы мтДНК, за исключением одного из 34 обнаруженных – предкового гаплотипа филогенетической группы северной мальмы. Учитывая приведенные выше данные Сенчуковой (2014), возникает вопрос о таксономическом статусе белого гольца из разных локальностей. Очевидно полное или почти полное отсутствие потока генов между локальностями белого гольца из р. Камчатка и оз. Кроноцкое. Это обстоятельство, а также относительно небольшая численность локальных популяций и значительное время изоляции (около 14 тыс. лет) могли усилить их дивергенцию под действием случайного генетического дрейфа и привести к столь различ-

¹ Работа поддержана грантами РФФИ № 15-29-02421 (Л.А. Животовский), № 14-04-01437 (С.Д. Павлов) и РНФ № 14-50-00029 (депонирование и предоставление коллекций).

ным спектрам изменчивости мтДНК, наблюдаемым в настоящее время (Олейник и др., 2010).

Принимая во внимание возможность быстрых эволюционных процессов у гольцов, их предположительно низкую эффективную численность, а также возможные периоды низкой численности (так называемое горлышко бутылки) в их эволюционном прошлом, можно предположить, что подобные значительные различия между локальными группировками белого гольца затронули и другие участки генома данного вида. Мы решили проверить это, используя участки генома, которые могут быть подвержены быстрым эволюционным перестройкам. Было решено исследовать первичную структуру локусов *OMM1037* и *Ots102*, так как ранее было показано, что по этим локусам хорошо выявляются межвидовые различия среди лососевых рыб (Животовский и др., 2013; Шайхаев, Животовский, 2014).

Материал и методика. Белого гольца из бассейна р. Камчатка ($n = 6$) отлавливали в р. Радуга с 25 по 30 июля 2008 г., а из оз. Кроноцкое ($n = 10$) – с 26 августа по 15 сентября 2003 г.

ДНК выделяли из соединительной ткани плавника рыбы при помощи набора "Diatom DNA prep 200", ООО "Лаборатория Изоген". Для проведения ПЦР-амплификации использовали набор реагентов "GenPak PCR Core" ООО "Лаборатория Изоген", содержащий ингибированную для "горячего старта" *Taq* ДНК полимеразу, дезоксинуклеозид трифосфаты и хлорид магния с конечными концентрациями соответственно 1 μ М, 200 μ М и 2.5 мМ, а также оптимизированную буферную систему для проведения ПЦР. Конечный объем ПЦР-смеси – 20 мкл, конечная концентрация праймеров в реакции – 0.1–0.5 μ М, количество ДНК – 20–100 нг. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе "Applied Biosystems 9800 Fast Thermal Cycler". Структура праймеров указана в табл. 1. Программа амплификации включала следующие стадии: предварительная денатурация при 95°C (1 мин); 32 цикла при 95°C (20 с), 58°C (20 с), 74°C (30 с) и заключительный синтез при 74°C (2 мин). Фрагментный анализ выполняли в блоке 6% неденатурирующего полиакриламидного геля в 0.5 \times ТВЕ. Элюцию

Таблица 1. Праймеры для амплификации локусов *OMM1037* и *Ots102*

Локус	Праймер	Температура отжига, °C
<i>OMM1037</i>	5'-gaacggcgactggatttaataact-3' 5'-ccgctcaccctcgtctcttaa-3'	58
<i>Ots102</i>	5'-ggatccaataaggagtgatatagtag-3' 5'-tatccctttaccatttccttgcta-3'	58

ПЦР-продуктов проводили из 2% агарозного геля. Для элюции использовали набор "Diatom DNA elution" ООО "Лаборатория Изоген". Все стадии анализа выполняли согласно инструкциям использованных наборов. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили в компании "Синтол". Последовательности для белого гольца *Salvelinus albus* из р. Камчатка, а также сиквенсы для другого вида гольцов – кунджи *S. leucomaenis* и чавычи *Oncorhynchus tshawytscha* взяты из нашей публикации (Шайхаев, Животовский, 2014).

Результаты и обсуждение. Все амплифицированные фрагменты ДНК были предварительно генотипированы путем электрофореза в полиакриламидном геле. Среди 10 особей *S. albus* из оз. Кроноцкое были обнаружены три гомозиготы по локусу *OMM1037*, которые затем были успешно секвенированы. Однако по локусу *Ots102* гомозиготных генотипов обнаружено не было. Тем не менее по этому локусу удалось элюировать и успешно секвенировать один аллель у одной из этих особей; другой аллель был частично амплифицирован, показав совпадение с первым аллелем.

Основные различия между исследованными особями белого гольца из двух бассейнов по изученным локусам наблюдали в зоне повторов, а также SNP в 3'-фланкирующей зоне локуса *OMM1037* (табл. 2). Эти различия возникли путем нескольких нуклеотидных замещений и инсерций/делеций. В целом обнаруженные нами различия между особями белого гольца из р. Камчатка и оз. Кроноцкое намного превышают

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности микросателлитных локусов *OMM1037* и *Ots102* и 3'-фланкирующей праймерной зоны *OMM1037* у белого гольца *Salvelinus albus* из р. Камчатка и оз. Кроноцкое, у кунджи *S. leucomaenis* и чавычи *Oncorhynchus tshawytscha*

Вид, место сбора	Повторяющаяся последовательность (5'→3')	Нуклеотидная позиция (3'←5')								
		48	49	50	53	54	59	60	61	62
<i>OMM1037</i>										
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	(ga) ₅ gg(gaaa) ₄₋₆ gaag(gaaa) ₂ ggaa(gaag) ₂ gaaaga(gaa) ₂	g	a	g	t	g	a	a	g	g
<i>Salvelinus albus</i> , р. Камчатка	(ga) ₅ gg(gaaa) ₄₋₈ gggaagaaggaaaggaaaga(gaa) ₂	–	–	–	–	–	g	–	t	–
<i>S. albus</i> , оз. Кроноцкое	(ga) ₆ gg(gaaa) ₅ (ggaaggaaa) ₁₋₂ gaaaga(gaa) ₂	–	g	–	–	–	g	–	t	–
<i>S. leucomaenis</i>	(ga) ₅ gggg(gaaa) ₃ ggaaggaaagaaggaaaga(gaa) ₂	–	–	–	c	–	g	–	t	–
<i>Ots102</i>										
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	ggcctgtcagcc(tgcc) ₅ tgtc(tgcc) ₃ (tgct) _n (tgcc) ₅ tgct(tctg) ₄ ctggttt									
<i>Salvelinus albus</i> , р. Камчатка	ggtc(tgct) _n (tgcc) _n tgcc(tgctggtc) _n (tgct) ₄ (tgctgct) ₄ (tgcc) ₂ tgcc(tgct) ₂ ttgct(tgct)tgccagttt									
<i>S. albus</i> , оз. Кроноцкое	ggtc(tgct) _n (tgcc) _n (tgct) _n tgccagttt									
<i>S. leucomaenis</i>	ggctgtc(tgcc) _n (tgct) _n (tgcc) ₂ (tgct) ₂ tgccgtgctgct(tgctgct) ₂ tgcca gttt									

Примечание. Основные отличия белого гольца из р. Камчатка и оз. Кроноцкое подчеркнуты. Данные отличия не могут быть объяснены обычными межпопуляционными различиями, т.е. числом регулярных повторов типа tgct, tgcc и др. Они обусловлены рядом точковых замен и инсерций/делеций, что необычно для внутривидовой микросателлитной изменчивости. Кроме того, у гольца оз. Кроноцкое обнаружена замена в 49-й позиции 3'-конца последовательности локуса *OMM1037*.

обычные межпопуляционные различия по микросателлитным локусам, которые в основном обусловлены лишь изменением числа регулярных повторов, как установлено нами ранее для белого гольца р. Камчатка, кунджи и других видов лососевых рыб (Животовский и др., 2013).

Таким образом, полученные данные показывают, что генетические различия между белым гольцом из р. Камчатка и оз. Кроноцкое достоверны, выявляются как минимум по одному типу маркеров и могут соответствовать более высокому таксономическому уровню, чем просто различия между двумя группировками одной формы, возможно, даже подвидовому. Остается некоторая вероятность ошибки при определении форм во время полевых сборов, так как идентификация обеих популяций проводилась в разные годы и разными исследователями. Тем не менее полученные данные свидетельствуют о существующей проблеме таксономического статуса разных популяций белого гольца. Для окончательного решения этого вопроса следует собрать данные "одними руками", чтобы обеспечить одинаковые критерии при видовой идентификации, а также провести широкогеномное исследование белого гольца из разных локальностей с привлечением достаточного набора близкородственных видов и форм гольцов.

Выражаем глубокую признательность М.Ю. Ковалеву за помощь в сборе материала по белому гольцу р. Камчатка и В.А. Паренскому за его таксономическую идентификацию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Викторовский Р.М. Механизмы видообразования у гольцов Кроноцкого озера. М.: Наука. 1978. 112 с.
- Глубоковский М.К. *Salvelinus albus* sp. n. из бассейна р. Камчатки // Биол. моря. 1977. № 4. С. 48–56.
- Глубоковский М.К. Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука. 1995. 341 с.
- Животовский Л.А., Шайхаев Е.Г., Шумова М.В. Метод идентификации биологических образцов лососевых рыб по микросателлитным маркерам с использованием идентичного набора ПЦР-праймеров // Биол. моря. 2013. Т. 39, № 6. С. 459–466.
- Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков В.А. Генетическая дивергенция митохондриальной ДНК белого гольца *Salvelinus albus* и северной мальмы *Salvelinus malma malma* // Генетика. 2010. Т. 46, № 3. С. 389–400.
- Павлов С.Д., Кузищин К.В., Груздева М.А. и др. Фенетическое разнообразие и пространственная структура гольцов (*Salvelinus*) озерно-речной системы Кроноцкая (восточная Камчатка) // Вопр. ихтиологии. 2013. Т. 53, № 6. С. 645–670.
- Савваитова К.А. Морфологические особенности и изменчивость локальных популяций озерно-речной формы гольца *Salvelinus alpinus* (L.) из водоемов бассейна р. Камчатки // Вопр. ихтиологии. 1970. Т. 10, вып. 2. С. 300–318.
- Савваитова К.А. Арктические гольцы. М.: Агропромиздат. 1989. 224 с.
- Сенчукова А.Л. Генетическая дифференциация гольцов (род *Salvelinus*) озерно-речной системы Кроноцкая (Камчатка): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М. 2014. 24 с.
- Черешнев И.А., Волобуев В.В., Шестаков А.В., Фролов С.В. Лососевидные рыбы Северо-Востока России. Владивосток: Дальнаука. 2002. 496 с.
- Шайхаев Е.Г., Животовский Л.А. Эволюция микросателлитных локусов лососевых рыб // Генетика. 2014. Т. 50, № 8. С. 967–974.