

УДК 575.86:597.553.2

РОДСТВЕННЫЕ ОТНОШЕНИЯ ГОЛЬЦА *SALVELINUS* SP. 4 (SALMONIFORMES: SALMONIDAE) ИЗ ОЗЕРА НАЧИКИНСКОЕ (КАМЧАТКА) ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА ПОЛНЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ

© 2022 г. А. Г. Олейник¹, *, А. Д. Кухлевский¹, Л. А. Скурихина¹

¹Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: alla_oleinik@mail.ru

Поступила в редакцию 01.04.2021 г.

После доработки 20.04.2021 г.

Принята к публикации 22.04.2021 г.

Проведен сравнительный анализ изменчивости трех полных митохондриальных геномов эндемичного гольца *Salvelinus* sp. 4 из оз. Начикинского (Камчатка, Россия) и близкородственных гольцов из Азии и Северной Америки. Результаты филогенетического анализа полных митохондриальных геномов подтверждают близость *Salvelinus* sp. 4 и *Salvelinus alpinus erythrinus* из Северной Америки (NWT) и свидетельствуют о том, что таксоны представляют Арктическую филогенетическую группу гольца Таранца *Salvelinus taranetzi*. Получены новые доказательства того, что популяция *Salvelinus* sp. 4 из оз. Начикинского является изолированной популяцией *S. taranetzi*. Предполагая общее происхождение гольцов *Salvelinus* sp. 4 и *S. a. erythrinus* из географически изолированных популяций, мы оценили дивергенцию полных митохондриальных геномов, появившуюся в результате фрагментации ареала общего предка.

Ключевые слова: *Salvelinus*, голец Таранца, *S. taranetzi*, арктический голец, *S. alpinus erythrinus*, мтДНК, митогеном, филогения

DOI: 10.31857/S0134347522010089

Исследование полных митохондриальных геномов (митогеномов) лососевых рыб в последнее время достигло определенных успехов (Ноггео, 2017). В то же время информации о гольцах рода *Salvelinus* Richardson, 1836, который является доминирующим по биоразнообразию и численности, еще недостаточно для реконструкции непротиворечивой филогении. Для представителей рода *Salvelinus* характерны высокая морфологическая и экологическая изменчивость, быстрая радиация, интрогрессивная гибридизация и локальные адаптации (Klemetsen, 2010; Taylor, 2016), которые затрудняют филогенетические исследования, могут приводить к неточному определению видовой принадлежности отдельных популяций и, как следствие, к некорректным филогенетическим выводам. Однако ревизия возможна только при наличии митогеномов всех таксонов рода.

Филогенетические исследования узкоареальных, эндемичных и спорных таксонов гольцов, оригинальные описания большинства из которых основаны исключительно на морфологических признаках, значительно выиграют от секвенирования митогеномов (Balakirev et al., 2016; Oleinik

et al., 2019, 2020). Среди таких таксонов выделяется *Salvelinus* sp. – эндемичный голец из оз. Начикинского (Викторовский, 1978). По мнению Викторовского (1978), своеобразие *Salvelinus* sp. обусловлено древностью депрессии ледникового озера, которое никогда не подвергалось влиянию трансгрессий. Значительный вклад в изучение морфологии и экологии озерного гольца внесла Савваитова (1989), показавшая, что этот голец представляет внутривидовую биологическую форму мальмы в составе комплекса *Salvelinus alpinus* (Linnaeus, 1758). Впоследствии озерный голец рассматривался в ранге подвида *Salvelinus czerskii* Drjagin, 1932 (см.: Глубоковский, 1995). Однако Черешнев (1990), а затем Богущкая и Насека (2004) отнесли его к виду *Salvelinus* sp. 4. Несмотря на то, что предыдущие молекулярные исследования *Salvelinus* sp. 4 ограничены анализом нескольких митохондриальных генов (Олейник, Скурихина, 2007; Олейник и др., 2015, 2019; Сенчукова и др., 2015), они позволили выявить филогенетическую близость изолированной популяции из оз. Начикинского и гольцов Арктической филогруппы Чукотки и Северной Америки (Олейник и др., 2019).

Ранее был секвенирован митогеном *Salvelinus taranetzi* Kaganovsky, 1955 из места первоописания (Oleinik et al., 2019), но для дальнейшего изучения и более точной филогении рода важно было получить митогеномы *Salvelinus* sp. 4. и *S. a. erythrinus* из Северной Америки (NWT).

Анализ выполнен для трех экземпляров гольца *Salvelinus* sp. 4 из оз. Начикинское, п-ов Камчатка, Россия (53°01' N, 157°50' E) и для двух экземпляров *S. a. erythrinus* из р. Джейко (Jayko R.), о-в Виктория, Канада (69°42.56' N, 103°16.82' W). Геномная ДНК выделена из мышечной ткани и плазминок по стандартной методике (Sambrook et al., 1989). Амплификацию и последующее секвенирование геномных фрагментов проводили с использованием 23 пар специфических праймеров и набора BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США). Специфические праймеры для амплификации и секвенирования разработаны авторами на основе опубликованных в GenBank митогеномов гольцов рода *Salvelinus* с помощью программы mitoPrimer_V1 (Yang et al., 2011). Последовательности нуклеотидов определяли в генетическом анализаторе GA3500 (Applied Biosystems, США). Секвенированные фрагменты собраны в митогеномы и аннотированы с использованием Geneious R11 (<http://www.geneious.com/>).

Для представления филогенетических отношений построены дендрограммы *BioNJ* на основе LogDet дистанций и наибольшего правдоподобия (*ML*) для GTR + G + I модели нуклеотидных замещений, выбранной на основе BIC-критерия. Эвристический поиск *ML*-деревьев выполнен в 100 повторностях со случайным включением последовательностей и с перестановками по SPR-алгоритму. Устойчивость топологий всех деревьев оценивали с помощью бутстрэп анализа (1000 реплик). Статистический и филогенетический анализы проводили в программе MEGA X (Kumar et al., 2018). Для подтверждения филогенетического положения *Salvelinus* sp. 4 и *S. a. erythrinus* из базы данных GenBank в анализ включены 27 митохондриальных геномов представителей рода *Salvelinus* и внешних групп (*Parahucho*, *Salmo*) (табл. 1).

Размер митогеномов составил 16 654 пар нуклеотидов (пн) для *Salvelinus* sp. 4 (MW181766–MW181768) и 16 652 пн для *S. a. erythrinus* (MW664921, MW664922). Геномная организация была идентична типичным митогеномам лососевых рыб и включала два гена рРНК, 13 генов, кодирующих белки, 22 гена тРНК, а также некодирующие участки начала репликации легкой цепи (*OL*) и контрольной области (*CR*). Одинаковое расположение генов для всех новых митогеномов одновременно является типичным для видов рода *Salvelinus* (Balakirev et al., 2016; Oleinik et al., 2019, 2020). Процентное содержание нуклеотидных

оснований составило: А – 28.0%, Т – 26.4%, С – 28.6% и G – 17.0% с небольшим преобладанием АТ оснований (54.4%). Между последовательностями митогеномов *Salvelinus* sp. 4 и *S. a. erythrinus* обнаружены 23 нуклеотидные замены и одно различие в длине, обусловленное вставкой (*GA*) в некодирующей области (*OL*). Большая часть замен (16) располагалась в общих белок-кодирующих последовательностях (*ND1*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *ND6*, *COI*, *COIII*, *Cytb*), для которых соотношение синонимичных и несинонимичных замен составило 11/5. В то же время между митогеномами *Salvelinus* sp. 4 и *S. taranetzi* обнаружены 44 нуклеотидные замены, 36 из которых располагались в белок-кодирующих последовательностях (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *ND6*, *COI*, *COII*, *COIII*, *ATP6*, *Cytb*). Соотношение синонимичных и несинонимичных замен в этом случае составило 31/5. Гены, кодировавшие белки, имели разную степень изменчивости, самую высокую – для субъединиц NADP-дегидрогеназы (47.8 и 52.3% от всех вариабельных сайтов для двух пар сравнения). При этом общая длина генов тРНК была одинаковой (1560 пн) у новых митогеномов и *S. taranetzi*.

Минимальные оценки дивергенции обнаружены между митогеномами *Salvelinus* sp. 4 и *S. a. erythrinus* ($D_{xy} = 0.0011 \pm 0.0002$, использовались LogDet дистанции). Дивергенция последовательностей (в среднем 0.00242 ± 0.00061) между исследованными образцами *Salvelinus* sp. 4 и митогеномами *S. taranetzi* (МК695630, МК695631) не превышала уровень внутривидовой изменчивости для *S. taranetzi* (Олейник и др., 2015, 2019). В то же время *Salvelinus* sp. 4 и *S. a. erythrinus* показали одинаковый уровень дивергенции (в среднем 0.0110 ± 0.0007) с митогеномами *S. a. alpinus* (MN957795–MN957797) и *S. a. oquassa* (AF154851), соответствующий межвидовой изменчивости гольцов (Олейник и др., 2015). Филогенетические деревья гольцов рода *Salvelinus* (*BioNJ*, *ML*), полученные на основе митогеномов, имели одинаковую топологию с идентичным составом кластеров, длинами ветвей и статистической поддержкой узлов (рис. 1).

Современные взгляды на филогению рода основаны на изучении изменчивости *CR* мтДНК (Brunner et al., 2001; Yamamoto et al., 2014). Выделено несколько филогенетических групп, объединяющих близкородственных гольцов (Атлантическая, Сибирская, Акадийская, Арктическая, Берингийская, Западная и Восточная тихоокеанские). Предложено также выделить самостоятельную Арктическую филогенетическую группу *S. taranetzi* (Олейник и др., 2015), в которую входят азиатские и североамериканские гольцы с соответствующими гаплотипами. Наши результаты свидетельствуют о том, что *Salvelinus* sp. 4 и *S. a. erythrinus* (NWT) принадлежат к Арктиче-

Таблица 1. Список таксонов голецов рода *Salvelinus* и внешних групп (*Parahucho*, *Salmo*) с Genbank-номерами полных митохондриальных геномов, включенных в филогенетический анализ

Таксон	Видовое название	Длина (пн)	GenBank-номер
<i>Salvelinus albus</i>	Белый голец	16653	KT266870
<i>Salvelinus albus</i>	Белый голец	16653	KT266871
<i>Salvelinus alpinus</i>	Арктический голец	16659	NC000861
<i>Salvelinus alpinus alpinus</i>	Арктический голец	16657	MN957795
<i>Salvelinus alpinus alpinus</i>	Арктический голец	16655	MN957796
<i>Salvelinus alpinus alpinus</i>	Арктический голец	16655	MN957797
<i>Salvelinus alpinus erythrinus</i>	Арктический голец	16652	MW664921
<i>Salvelinus alpinus erythrinus</i>	Арктический голец	16652	MW664922
<i>Salvelinus boganidae</i>	Боганидский голец	16655	MK695623
<i>Salvelinus curilus</i>	Южная мальма	16654	NC024585
<i>Salvelinus curilus</i>	Южная мальма	16652	NC037502
<i>Salvelinus elgyticus</i>	Малоротая паляя	16654	MK695624
<i>Salvelinus elgyticus</i>	Малоротая паляя	16654	MK695625
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Американская малоротая паляя	16624	NC000860
<i>Salvelinus leucomaenis</i>	Кунджа	16655	KF974451
<i>Salvelinus levanidovi</i>	Гонец Леванидова	16624	MK695626
<i>Salvelinus malma kuznetzovi</i>	Каменный голец	16654	KU674351
<i>Salvelinus malma kuznetzovi</i>	Каменный голец	16654	KU674352
<i>Salvelinus malma malma</i>	Северная мальма	16654	KJ746618
<i>Salvelinus namaycush</i>	Озерная паляя	16653	NC036392
<i>Salvelinus</i> sp. 4	Начикинский голец	16654	MW181766
<i>Salvelinus</i> sp. 4	Начикинский голец	16654	MW181767
<i>Salvelinus</i> sp. 4	Начикинский голец	16654	MW181768
<i>Salvelinus taranetzi</i>	Гонец Таранца	16654	MK695630
<i>Salvelinus taranetzi</i>	Гонец Таранца	16654	MK695631
<i>Salvethymus svetovidovi</i>	Длинноперая паляя Световидова	16655	MK695627
<i>Salvethymus svetovidovi</i>	Длинноперая паляя Световидова	16655	MK695628
<i>Salvethymus svetovidovi</i>	Длинноперая паляя Световидова	16655	MK695629
<i>Salmo salar</i>	Атлантический лосось	16669	AF133701
<i>Salmo trutta trutta</i>	Кумжа	16677	AM910409
<i>Parahucho perryi</i>	Сахалинский таймень	16652	KJ816315
<i>Parahucho perryi</i>	Сахалинский таймень	16653	KJ816316

Примечание. Жирным шрифтом выделены номера полных митохондриальных геномов, секвенированных в настоящей работе.

ской филогруппе *S. taranetzi*. В целом это согласуется с предыдущими результатами, полученными для последовательностей генов *Cytb*, *COI* и *CR* (Сенчукова и др., 2015; Олейник и др., 2019; Esin et al., 2017). Положение *Salvelinus* sp. 4 на филограмме строго определено и статистически подтверждено (99%), так же как и сестринские отношения между *Salvelinus* sp. 4 – *S. a. erythrinus* и *S. taranetzi* (100%). Ранее нам удалось решить проблему взаимоотношений *S. taranetzi* из Азии и *S. a. erythrinus* из Северной Америки (NWT), доказав их филогенетическую близость (Олейник и др., 2019). Не вызывает сомнений, что голецы

Арктической филогруппы из Северной Америки *S. a. erythrinus* (синонимы: *S. a. stagnalis*, *S. a. taranetzi*) и Северо-Восточной Азии принадлежат к одному виду, который впервые был описан как голец Таранца *S. taranetzi* Кагановский, 1955 из оз. Аччен (Чукотка). При сравнении митогеномов мы получили новые доказательства того, что популяция голецов из оз. Начикинское, характеризующихся уникальным набором морфологических признаков (Савваитова, 1989), тем не менее является изолированной популяцией *S. taranetzi*.

Филогения рода *Salvelinus* на основе митогеномов свидетельствует о том, что генетическое

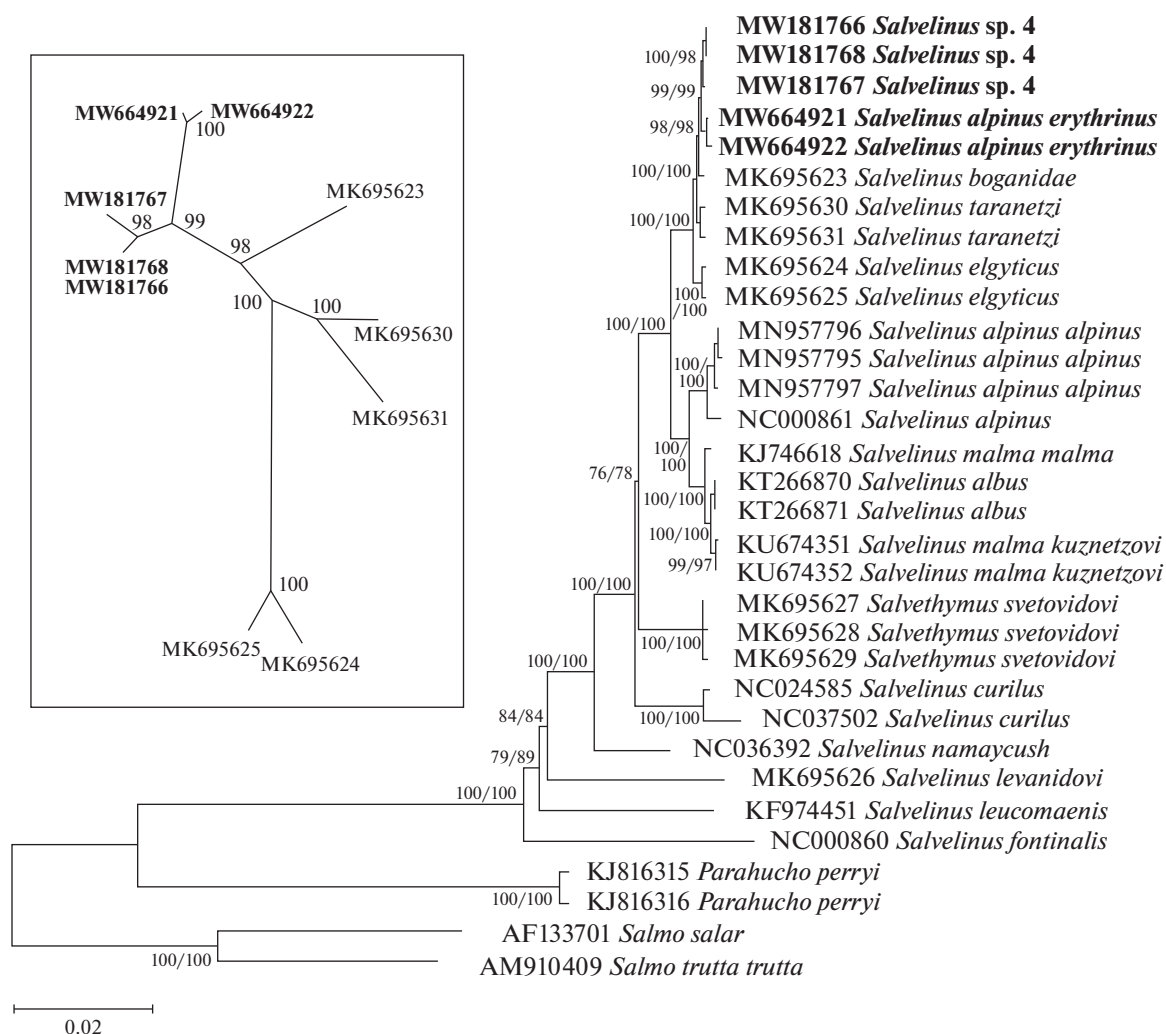


Рис. 1. ML-дерево, построенное на основе сравнения полных митохондриальных геномов *Salvelinus* sp. 4 и других представителей гольцов рода *Salvelinus*. Цифры в узлах соответствуют значениям бутстрэп поддержки для ML- и BioNJ-деревьев соответственно. Вставка – бескорневое BioNJ-дерево гольцов Арктической филогенетической группы (по: Олейник и др., 2015). Жирным шрифтом выделены полные митохондриальные геномы, исследованные в настоящей работе.

сходство географических выборок *Salvelinus* sp. 4 и *S. a. erythrinus* обусловлено послеледниковой колонизацией из общих источников. Низкий уровень дивергенции митогеномов при наличии хоминга и отсутствии проходной стадии у озерных гольцов, вероятно, сформировался в результате фрагментации ареала общего предка.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 20-04-00205).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы посвящают эту статью памяти выдающегося ихтиолога Игоря Александровича Черешнева и выражают глубокую признательность С.В. Фролову и J.-S. Moore, безвозмездно пополнившим коллекцию препаратов ДНК гольцов рода *Salvelinus* Лаборатории генетики ННЦМБ ДВО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Богуцкая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номен-

- клатурными и таксономическими комментариями. М.: Товарищество науч. изд. КМК. 2004. 389 с.
- Викторовский Р.М. Механизмы видообразования у гольцов Кроноцкого озера. М.: Наука. 1978. 111 с.
- Глубоковский М.К. Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука. 1995. 343 с.
- Олейник А.Г., Скурихина Л.А. Генетическая дивергенция симпатричных гольцов рода *Salvelinus* из озера Начикинское (Камчатка) // Генетика. 2007. Т. 43. № 8. С. 1097–1106.
- Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков В.А. Филогения гольцов рода *Salvelinus* по данным анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2015. Т. 51. № 1. С. 63–77.
- Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Кухлевский А.Д., Бондарь Е.И. Генетическая дифференциация гольцов Арктической группы Северо-Восточной Азии и Северной Америки // Генетика. 2019. Т. 55. № 3. С. 325–336.
- Савваитова К.А. Арктические гольцы (структура популяционных систем, перспективы хозяйственного использования). М.: Агропромиздат. 1989. 224 с.
- Сенчукова А.Л., Павлов С.Д., Есин Е.В. и др. Гольцы рода *Salvelinus* из озера Начикинское (Камчатка) и их положение в филогенетической системе *S. alpinus* – *S. malma* // Вопр. ихтиологии. 2015. Т. 55. № 1. С. 74–81.
- Черешнев И.А. Состав ихтиофауны и особенности распределения пресноводных рыб в водоемах Северо-востока СССР // Вопр. ихтиологии. 1990. Т. 30. № 5. С. 836–844.
- Balakirev E.S., Parensky V.A., Kovalev M.Yu., Ayala F.J. Complete mitochondrial genome of the stone char *Salvelinus kuznetzovi* (Salmoniformes, Salmonidae) // Mitochondrial DNA, Part B: Resources. 2016. V. 1. № 1. P. 287–288.
- Brunner P.C., Douglas M.R., Osinov A. et al. Holarctic phylogeography of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences // Evolution. 2001. V. 55. № 3. P. 573–586.
- Esin E.V., Bocharova E.S., Mugue N.S., Markevich G.N. Occurrence of sympatric charr groups, *Salvelinus*, Salmonidae, in the lakes of Kamchatka: a legacy of the last glaciations // J. Fish Biol. 2017. V. 91. № 2. P. 628–644.
- Horreo J.L. Revisiting the mitogenomic phylogeny of Salmoninae: new insights thanks to recent sequencing advances // PeerJ. 2017. V. 5. Art. ID e3828. <https://doi.org/10.7717/peerj.3828>
- Klemetsen A. The charr problem revisited: Exceptional phenotypic plasticity promotes ecological speciation in post-glacial lakes // Freshwater Rev. 2010. V. 3. P. 49–74.
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Kухлевский А.Д., Семеченко А.А. Complete mitochondrial genome and phylogenetic position of the Taranetz charr *Salvelinus taranetzi* Kaganovsky, 1955 (Salmoniformes: Salmonidae) // Mitochondrial DNA, Part B: Resources. 2019. V. 4. № 2. P. 2491–2492.
- Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Kухлевский А.Д., Семеченко А.А. Complete mitochondrial genomes of the Arctic charr *Salvelinus alpinus alpinus* Linnaeus (Salmoniformes: Salmonidae) // Mitochondrial DNA, Part B: Resources. 2020. V. 5. № 3. P. 2895–2897. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23802359.2020.1791015>.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1989. 1626 p.
- Taylor E.B. The Arctic char (*Salvelinus alpinus*) “complex” in North America revisited // Hydrobiologia. 2016. V. 783. № 1. P. 283–293.
- Yamamoto S., Maekawa K., Morita K. et al. Phylogeography of the salmonid fish, Dolly Varden *Salvelinus malma*: Multiple glacial refugia in the North Pacific rim // Zool. Sci. 2014. V. 31. № 10. P. 660–670.
- Yang C.-H., Chang H.-W., Ho C.-H. et al. Conserved PCR primer set designing for closely-related species to complete mitochondrial genome sequencing using a sliding window-based PSO algorithm // PLoS One. 2011. V. 6. Art. ID. e17729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017729>

Relationships of Charrs *Salvelinus* sp. 4 (Salmoniformes: Salmonidae) from Lake Nachikinskoe, Kamchatka, as Inferred from Complete Mitochondrial Genome Analysis

A. G. Oleinik^a, A. D. Kухлевский^a, and L. A. Skurikhina^a

^aA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

We have performed a comparative analysis of complete mitochondrial genomes variability of the endemic charr *Salvelinus* sp. 4 from Lake Nachikinskoe (Kamchatka, Russia) and closely related charrs of Asia and North America. Results of the phylogenetic analysis of their complete mitochondrial genomes confirm the close relationships between *Salvelinus* sp. 4 and *S. alpinus erythrinus* from North America (NWT) and indicate these taxa to represent the Arctic phylogenetic group of the Taranetz charr, *Salvelinus taranetzi*. New evidence has been obtained that the population of *Salvelinus* sp. 4 from Lake Nachikinskoe is an isolated population of *S. taranetzi*. Assuming the common origin of *Salvelinus* sp. 4 and *S. a. erythrinus* from geographically isolated populations, we have estimated the divergence of complete mitochondrial genomes that emerged due to the fragmentation of their common ancestor’s range.

Keywords: *Salvelinus*, Taranetz charr, *S. taranetzi*, Arctic charr, *S. alpinus erythrinus*, mtDNA, mitogenome, phylogeny