

На правах рукописи



Апаликова
Ольга Владимировна

**Филогенетический анализ двух форм серебряного
карася *Carassius auratus gibelio* Bloch на основе
изменчивости митохондриальной ДНК**

03.00.15 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

3 0 ОНТ 2008

Владивосток – 2008

Работа выполнена в Институте биологии моря
им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской Академии наук

Научный руководитель

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Брыков Владимир Алексеевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Фролов Сергей Владимирович

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Челомина Галина Николаевна

Ведущая организация

Институт проблем экологии и эволюции
имени А.Н. Северцова

Защита состоится 14 ноября 2008 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.005.008.01 при Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон: (4232) 310-905, факс: (4232) 310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).
Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан 10 октября 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Вашенко

Вашенко М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одним из модельных видов для изучения процессов видообразования путем полиплоидизации является серебряный карась *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782). В восточных популяциях Евразии (Японские острова, Северный Китай, Дальний Восток России) обнаруживаются бисексуальная диплоидная и гиногенетическая полиплоидная формы серебряного карася в разных соотношениях. В Сибири, на Урале, в Средней Азии и в европейской части ареала вида встречается главным образом триплоидная форма, которая размножается с участием самцов других карповых рыб (Головинская и др., 1965; Никольский, 1974; Кирпичников, 1987). Это дает основание полагать, что регион Дальнего Востока является местом их происхождения. До сих пор остаются неясными филогенетические отношения форм серебряного карася с различающимися типами репродукции. Их морфологическое сходство (Васильева, Васильев, 2000) свидетельствует либо о недавней дивергенции, либо о постоянно идущем процессе генетического обмена.

Перечисленные проблемы определили необходимость данного исследования, а также его цели и задачи.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было сопоставление плоидности особей в выборках серебряного карася из водоемов Дальнего Востока, Средней Азии и европейской части России с данными по филогеографии серебряного карася для выяснения механизмов возможного генетического обмена между гиногенетической полиплоидной и бисексуальной диплоидной формами, а также уточнения места их дивергенции.

В работе поставлены следующие задачи:

1. Определить плоидность особей из выборок серебряного карася *Carassius auratus gibelio*, полученных из водоемов Дальнего Востока, Средней Азии и европейской части России.
2. Определить уровень внутривидовой изменчивости у серебряного карася *Carassius auratus gibelio* на основании данных полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) участков митохондриальной ДНК, кодирующих 3-ю и 4-ю субъединицы надоксиддегидрогеназы и две субъединицы (12S/16S) рибосомальной РНК, амплифицированных в полимеразной цепной реакции (ПЦР).
3. Сопоставить данные по плоидности с данными по внутривидовой изменчивости мтДНК *Carassius auratus gibelio*.
4. Изучить распределение бисексуальной диплоидной и гиногенетической полиплоидной форм серебряного карася на значительной части его ареала.

Научная новизна работы. Результаты проведенного исследования расширяют представления о механизмах, обеспечивающих морфологическое и генетическое единство клональных и бисексуальных форм в диплоидно-полиплоидных комплексах рыб. Впервые выполнен анализ изменчивости митохондриальной ДНК двух форм серебряного карася *Carassius auratus gibelio* из популяций Дальнего Востока, европейской части России и Средней Азии, а также установлена связь между способом репродукции серебряного карася и генетической изменчивостью на основе результатов ПЦР-ПДРФ мтДНК. Впервые приведены молекулярно-генетические доказательства существования генетического обмена между двумя формами серебряного карася и предложена гипотеза о механизме трансформации триплоидной гиногенетической формы в диплоидную бисексуальную форму. Доказано, что Дальний Восток является местом дивергенции бисексуальной и гиногенетической форм.

Практическая значимость работы

Результаты работы могут быть использованы при разведении серебряного карася в аквакультуре, для выведения его новых форм. Представленный материал может быть

использован в курсе лекций по теории эволюции для студентов биологических специальностей ВУЗов.

Апробация работы. Основные результаты данной работы представлены на конференции «Современные проблемы биологической эволюции» к 100-летию Государственного Дарвиновского музея (Москва, 2007), на конференции «Чтения памяти профессора Владимира Яковлевича Леванидова» (Владивосток, 2008), на Международной научно-практической конференции "Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб" (Санкт - Петербург, сентябрь 2008), на ежегодных научных конференциях ИБМ (2005, 2008), лабораторных семинарах.

Публикации.

По материалам диссертации опубликованы 5 научных работ, в том числе, 2 статьи – в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 123 страницах, иллюстрирована 23 рисунками и содержит 24 таблицы, 13 из которых представлены в приложении. Список литературы содержит 159 источников, из них 52 на русском языке.

Благодарности. Автор считает своим приятным долгом выразить глубокую признательность своему руководителю Владимиру Алексеевичу Брыкову за внимательное и конструктивное руководство. Автор выражает благодарность группе ученых за помощь в сборе материала для настоящей работы: Вл.А. Брыкову, С.М. Долганову, М.Ю. Ковалеву, Н.Е. Поляковой, С.В. Фроловой, Н.Е. Ламаш. За неоценимую помощь в работе и при обсуждении диссертации автор благодарит к.б.н. М.Г. Елисейкину и д.б.н. С.В. Фролова, а также весь коллектив лаборатории генетики ИБМ ДВО РАН за всемерную помощь и моральную поддержку.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объекты исследования. *Carassius auratus gibelio* (380 экз.), *Carassius carassius* (2 экз.) и *Cyprinus carpio* (3 экз.).

Выделение и амплификация ДНК. Тотальную ДНК выделяли по стандартной методике (Sambrook *et al.*, 1989) из фиксированной этанолом сердечной мышцы.

ПЦР-ПДРФ – анализ. Амплифицировали 2 участка мтДНК: ND3/ND4L/ND4, кодирующий 3-ю и 4-ю субъединицы надоксиддегидрогеназы, и 12S/16S рРНК, кодирующий субъединицы рибосомальной РНК. ПЦР-фрагменты обрабатывали рестрикционными эндонуклеазами *AvaI*, *BsuRI*, *CfrI*31, *BshI*2361, *Hin6I*, *HinfI*, *MspI*, *MvaI*, *RsaI* («Fermentas», Lithuania и «Сибээнзим», Новосибирск). Продукты рестрикции подвергали электрофорезу в 1,8% агарозном геле в 50М трис-боратном буфере (Sambrook *et al.*, 1989). Фрагменты ДНК в геле окрашивали этидиумбромидом и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Статистический анализ. Комбинированные гаплотипы каждой особи по исследованным участкам кодировались буквами. Данные по рестрикционным фрагментам преобразовывали в бинарные матрицы. Гаплотипическое (h) и нуклеотидное разнообразие (π), степень дивергенции между гаплотипами (p) определялись с помощью уравнений Nei (Nei, 1987) с использованием пакета программ REAP (McElroy *et al.*, 1992). Полученная в REAP матрица количественных значений дивергенции между гаплотипами использовалась для кластеризации и построения фенотипической диаграммы с использованием программы UPGMA [пакет программ NTSYS (Rohlf, 1990)]. Гетерогенность между выборками оценивали с помощью псевдовероятностного теста χ^2 (Zaykin, Pudovkin, 1993). Устойчивость полученных филогенетических деревьев оценивали методом бутстрепа (Felsenstein, 1985), используя 1000 бутстреп-реплик. Реконструкцию сетей гаплотипов (древ минимальной протяженности) проводили по принципу минимального числа нуклеотидных замен между гаплотипами (Prim, 1957; Rohlf, 1973). Величину различий и

вероятные альтернативные связи между ними рассчитывали в пакете программ Arlequin 2.000.

Анализ уровня плоидности проводили на основе данных количества ДНК в ядрах эритроцитов (по Фельгену), соотношения площадей ядер эритроцитов у особей с различным уровнем плоидности (Toth *et al.*, 2005) и на основе подсчета максимального количества ядрышек в ядрах эритроцитов на препаратах крови, окрашенных 50% AgNO₃ (Howell, Black, 1980).

Определение плоидности методом сравнения количества ДНК в ядрах эритроцитов. Цитологические препараты из ткани печени и селезенки получали после щелочной дезагрегации, окрашивали по Фельгену (Пирс, 1962) и фотографировали в одинаковых условиях. Морфометрический анализ ядер эритроцитов на препаратах проводили в программе Photoshop. У каждой особи определяли параметры для 40-100 эритроцитов. Расчет плоидности проводился сопоставлением средних значений, полученных по формуле $Q = (B-A) / S$, где B – интенсивность свечения фона, A – интенсивность свечения ядра, S – площадь ядра. Для каждой особи строилась гистограмма значений Q в программе Excel. У триплоидных и тетраплоидных особей значения Q были увеличены относительно значений, полученных для диплоидных особей.

Определение площади ядер эритроцитов. Измерения площади ядер проводили на препаратах крови из хвостовой артерии рыб, фиксированных 96% этанолом и окрашенных азокармином G (ООО «Биовитрум», Санкт-Петербург). Препараты анализировали на микроскопе Leica DM2500 при увеличении $\times 100$. Морфометрический анализ эритроцитов на снимках препаратов проводили в программе Photoshop. Для определения плоидности каждой особи строился график распределения частот площадей ядер эритроцитов, выраженных в условных единицах (пикселях). Все полученные гистограммы распределяли на три группы по средним значениям площадей. За 1 было принято среднее значение площади ядра эритроцита в группе с наименьшими значениями площади.

Подсчет максимального количества ядрышек в ядрах эритроцитов Предварительно фиксированные 96% этанолом препараты крови выдерживали в 2N растворе муравьиной кислоты в течение 1 часа (и более), отмывали их дистиллированной водой и высушивали. Затем на препарат наносили смесь 50% AgNO₃ и 2% раствора желатина в соотношении 1:2. Инкубацию проводили при 55°C под покровным стеклом в течение 10 мин до появления золотистого цвета в зоне окрашивания препарата. Максимальное количество ядрышек в клеточных ядрах, указывающее на уровень плоидности (Черфас, Ильясова, 1980; Takai, Ojima, 1982, Phillips *et al.*, 1986), анализировалось статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выяснение возможной связи между уровнем плоидности и генетической изменчивостью серебряного карася. К началу исследований было известно, что в восточных популяциях Евразии (Японские острова, Северный Китай, Дальний Восток России) обнаруживаются бисексуальная (диплоидная) и гиногенетическая (триплоидная) формы серебряного карася в разных соотношениях. Первый этап данного исследования был посвящен анализу плоидности особей в популяции серебряного карася одной реки и выяснению возможной связи между изменчивостью мтДНК и плоидностью у особей (фактически – типом размножения) у этого вида. В качестве модельной популяции была использована выборка (33 экз.) серебряного карася *Carassius auratus gibelio* из реки Раздольная. В выборке было обнаружено 14 диплоидных особей (бисексуальная форма), из них 5 самцов и 9 самок. Остальные 19 особей были триплоидными или тетраплоидными. Полученные результаты подтвердили представление о том, что в водоемах Дальнего Востока и в популяции р. Раздольной, в частности, выявляются диплоидная, по-видимому, бисексуальная форма, и триплоидная гиногенетическая форма.

С целью выяснения возможной связи между уровнем плоидности и генетической изменчивостью серебряного караса был проведен ПЦР-ПДРФ анализ мтДНК. В двух амплифицированных фрагментах мтДНК – ND3/ND4L/ND4 и 12S/16S рРНК– было выявлено 62 сайта рестрикции, из них 9 – полиморфные, на основе которых были составлены 5 комбинированных гаплотипов: А, В, В1, С, D. Гаплотипическая сеть серебряного караса выявила наличие двух группы гаплотипов (филогрупп), разделенных дистанцией в 12 нуклеотидных замен, в одну из которых входят гаплотипы А, С и D, а во вторую В и В1 (рис.1а). На UPGMA-дендрограмме все выявленные в популяции серебряного караса р. Суйфун гаплотипы также разделяются на две филогенетические группы, обозначенные нами как I-я и II-я (рис.1б), уровень дивергенции между которыми составляет 2.5% нуклеотидных замен. К I-ой филогенетической группе относятся особи

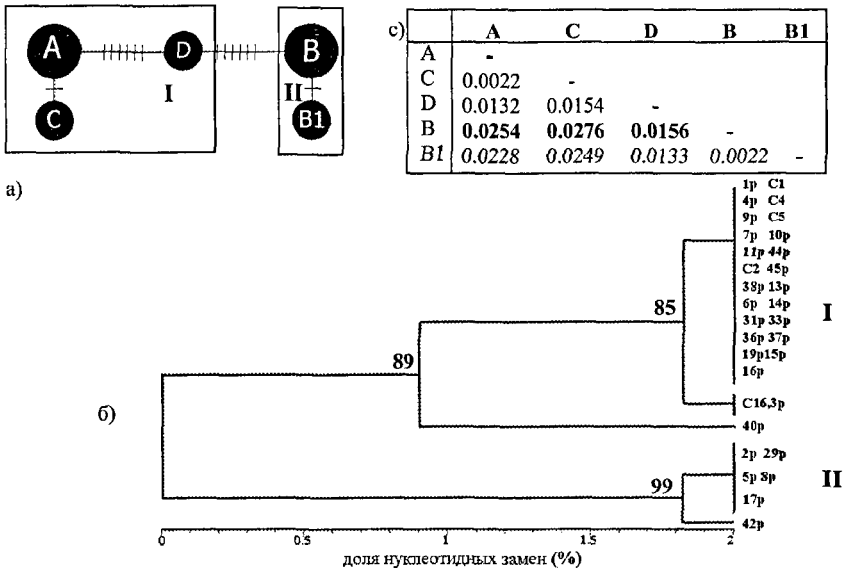


Рис. 1. а) Гаплотипическая сеть минимальной протяженности, демонстрирующая материнские генеалогии мтДНК серебряного караса из популяции р. Раздольной. б) UPGMA-фенограмма, построенная на основании матрицы расстояний между гаплотипами (с). По оси – величина дивергенции нуклеотидных последовательностей между гаплотипами особей. I, II – филогруппы. На фенограмме каждый гаплотип представлен особями, входящими в выборку.

с гаплотипами А, С и D, к другой (II-й) – особи с гаплотипами В и В1. У особей бисексуальной формы выявляются гаплотипы, относящиеся как к филогруппе I, так и филогруппе II: 3 самца из 5 характеризуются гаплотипами II-й филогруппы, и 2 – гаплотипом I-й. Из девяти диплоидных самок для трех характерен гаплотип II-й филогруппы, и для 6 – гаплотип I-й филогруппы. Тест на гетерогенность по частотам гаплотипов выявил высоко значимые различия при сравнении выборок диплоидных особей и особей с плоидностью 3n-4n ($df=3$; $\chi^2=12.5$; $p<0.001$).

Наличие у серебряного караса двух филогенетических линий мтДНК предполагает для этого вида этап дивергентной эволюции в прошлом. Исходя из примерной скорости нуклеотидных замен в 2% за 1 млн. лет, можно предположить, что это событие произошло около 1 млн. лет назад в регионе Дальнего Востока. Для пойкилотермных животных часто предполагается меньшая скорость дивергенции, около 1% (Avice, 2000). В этом случае время дивергенции форм отодвигается, составляя около 2,5 млн. лет назад.

Исходя из уникальных биологических особенностей этого вида, можно было предположить, что обнаруженные в результате ПДРФ - анализа две филогруппы мтДНК принадлежат двум генетически отличающимся формам – гиногенетической и бисексуальной. Сопоставление данных цитологического анализа по определению плоидности и данных ПДРФ показало, что, действительно, все триплоидные и тетраплоидные особи (гиногенетические) без исключения характеризуются гаплотипами, относящимися к I –й филогруппе. Этот факт в определенной степени согласуется с предположением о том, что дивергенция филогрупп мтДНК связана с формированием гиногенетической формы из бисексуальной 1,25 – 2,5 млн лет назад. Изменения окружающей среды, и, в частности – температуры, по-видимому, были одним из наиболее вероятных факторов в процессе образования гиногенетической формы. На изменение температуры как на фактор, влияющий на образование полиплоидов, указывают некоторые исследователи (Ruiguang *et al.*, 1986; Rishi *et al.*, 1998; Leggatt, Iwama, 2003). Очевидно, что дальнейшая эволюция гиногенетической и диплоидной форм проходила независимо на протяжении длительного времени, что позволило в результате накопления нуклеотидных различий сформироваться двум филогенетическим линиям мтДНК.

В то же время у особей диплоидной формы выявляются гаплотипы мтДНК, относящиеся к обеим филогруппам. И, таким образом, наличие между гиногенетическими и бисексуальными особями идентичных и близких гаплотипов мтДНК дает основание предполагать, что между отличающимися формами караса должен происходить генетический обмен. Такой обмен может быть обусловлен различными причинами. Наиболее вероятным представляется механизм трансформации одной формы в другую. На основании наших данных о том, что все без исключения гиногенетические особи несут гаплотипы одной филогруппы, а среди диплоидных особей, как самцов, так и самок, выявляются обе филогруппы мтДНК, можно утверждать, что существует ассиметричный (однаправленный) генетический обмен. Поскольку мтДНК передается только по материнской линии, можно предположить возможность трансформации гиногенетических особей в диплоидную бисексуальную форму. Вероятность обратной трансформации (из диплоидной в гиногенетическую форму) маловероятна или полностью исключена, поскольку среди гиногенетических особей мы не обнаруживаем особей со II-й филогруппой мтДНК. Механизмы трансформации одной формы в другую предложены на рис. 2.

1. Яйцеклетка гиногенетической триплоидной формы может быть оплодотворена сперматозоидом, принадлежащим особям диплоидной формы (рис.2а). С этим случае могут возникать тетраплоиды, если после оплодотворения происходит обычное митотическое деление дробления. Схема приведена на рисунке 2а. Действительно, Такаи и Оджима описывали появление тетраплоидных особей в потомстве триплоидных серебряных карасей *Carassius auratus langsdorfii* (Takai, Ojima, 1983). Наши данные по анализу плоидности, при котором в популяции р. Раздольной (и других водоемов, см. ниже) обнаруживаются особи с плоидностью большей, чем 3n, подтверждают возможность существования такого механизма. В том случае, если после оплодотворения проходит редукционное деление, и образуются диплоидные зиготы, такие особи могут оказаться фертильными.

2. Редукция числа хромосом может произойти еще на стадии формирования гамет у триплоидных гиногенетических особей. Такое явление описано для гибридов ♀*Carassius auratus* × ♂*Cyprinus carpio* (Liu *et al.*, 2006). Отмечено образование яйцеклеток с уровнем

плоидности $1n$, $2n$, $3n$, которые после оплодотворения могут формировать зиготы с плоидностью $2n$, $3n$, и $4n$ (Liu *et al.*, 2006) (рис. 26).

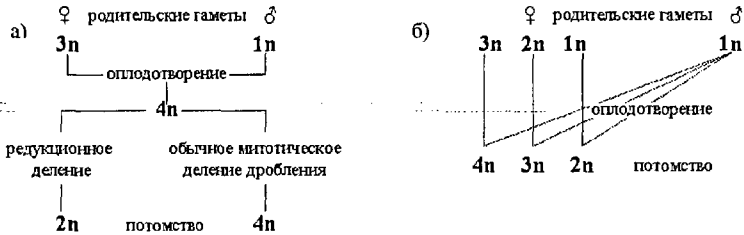


Рис. 2. Вероятный механизм трансформации триплоидной формы серебряного карася в диплоидную форму. а) Схема экспериментального получения диплоидного и тетраплоидного потомства при скрещивании триплоидной самки серебряного карася с диплоидным самцом. б) Варианты потомства с различной плоидностью, полученные при скрещивании гибридной самки с диплоидным серебряным карасем (по: Liu *et al.*, 2006).

В любом из представленных вариантов происходит частичное или полное объединение ядерных геномов. Вклад ядерного материала в случае появления таких особей может быть равным, или с преобладанием гиногенетического генома. Наличие такого механизма, даже если это явление происходит в популяциях с невысокой частотой, должно обеспечивать единство геномов и морфологическое сходство гиногенетической и гонохорической форм, что и наблюдается в природных популяциях (Васильева, Васильев, 2000). Кроме того, при любом варианте, вследствие материнского наследования, у образующихся диплоидных особей мтДНК будет только I-ого, «гиногенетического» типа. Таким образом, наличие у диплоидных особей обеих филогрупп мтДНК может объясняться существованием постулированного механизма в тех популяциях, где присутствуют обе формы.

На существование такого механизма указывают сообщения о периодическом, хотя и редком, появлении диплоидных самцов в гиногенетических популяциях серебряного карася (Головинская и др., 1965; Кирпичников, 1987). Имеются данные, согласно которым в неблагоприятных условиях, когда возрастает диапазон изменчивости, в гиногенетической популяции серебряного карася возникают быстро растущие и тугорослые формы, и среди тугорослых особей появляются самцы (Никольский, 1974). Кроме того, показана принципиальная возможность получения потомства при скрещивании гиногенетических самок с диплоидными самцами (Головинская и др., 1965; Кирпичников, 1987), что теоретически может приводить к образованию диплоидной формы. Экспериментально получено жизнеспособное тетраплоидное потомство при оплодотворении яйцеклеток триплоидной формы (*C. auratus langsdorfii*) спермой диплоидной формы (*C. auratus cuvieri*), и приведены доказательства формирования гибридного генома у особей в популяциях Японских островов (Takai, Ojima, 1983). Показана принципиальная возможность получения потомства при скрещивании гиногенетических самок с диплоидными самцами также в европейской популяции серебряного карася (Toth *et al.*, 2005), что может приводить к образованию диплоидной формы. Более того, появились данные, свидетельствующие о возможности проявления в гиногенетических популяциях серебряного карася элементов гонохории при размножении, когда при активации яйцеклеток гомологичной спермой происходит лишь частичная передача отцовских хромосом (или их фрагментов) потомкам (Zhou *et al.*, 2000).

Полученные нами результаты о существовании двух глубоко дивергировавших филогрупп мтДНК свидетельствуют о том, что, во-первых, появление двух форм было однократным актом. Во-вторых, генетический обмен между диплоидной и триплоидной формой существует, но при этом он ассиметричен, причем вклад генома гиногенетических особей в гибридный геном оказывается большим. Генетическим обменом может объясняться высокое морфологическое (и, вероятно, генетическое) сходство двух форм караса с разными типами репродукции. В то же время две образовавшиеся после дивергенции формы филогруппы мтДНК эволюционируют у этого вида независимо, как результат материнского наследования и отсутствия рекомбинации. Как следствие, мы не обнаруживаем II-й филогруппы мтДНК у особей с гиногенетическим типом размножения. Наши результаты дают основание предполагать, что в континентальных популяциях караса процесс трансформации гиногенетической формы в бисексуальную форму происходит часто, в то время как обратный переход очень редок или не случается вовсе.

Цитометрический анализ и цитоморфологические особенности диплоидных и полиплоидных особей *Carassius auratus gibelio*. Результаты кариологических исследований указывают на сложную генетическую природу серебряных карасей. Так, для триплоидной формы серебряного караса отмечены вариации числа хромосом в различных клонах: по литературным данным, число хромосом триплоидного *Carassius auratus gibelio* варьирует от 140 до 160 (Васильев, 1985; Fišter, Soldatovič, 1989; Fan, Shen, 1990; Boron, 1994).

Цитометрический анализ эритроцитов серебряных карасей с различной плоидностью показал, что соотношение средних значений площади диплоидных, триплоидных и тетраплоидных особей составляет 1 : 1,35 : 1,8, соответственно. В то же время у особей, относящихся ко второй филогруппе, средние значения площади ядра эритроцита несколько меньше, чем у особей, относящихся к первой («гиногенетической») филогруппе. Эти значения, полученные для диплоидных особей, относящихся ко второй филогруппе, диплоидов, относящихся к первой филогруппе, триплоидных и тетраплоидных особей можно представить как соотношение 1 : 1,09 : 1,46 : 1,97, соответственно. Эти результаты не являются статистически значимыми вследствие небольшого числа проанализированных особей, и пока не ясно, какое значение они могут иметь.

Окрашивание препаратов крови азотнокислым серебром выявляет ядерные структуры с высоким содержанием РНК: ядрышковые организаторы, ядрышки (Howell, Black, 1980). На рисунке 3 приведены картины окрашивания азотнокислым серебром клеток караса. Как видно, у диплоидных (рис. 3а) и триплоидных особей (рис. 3б)

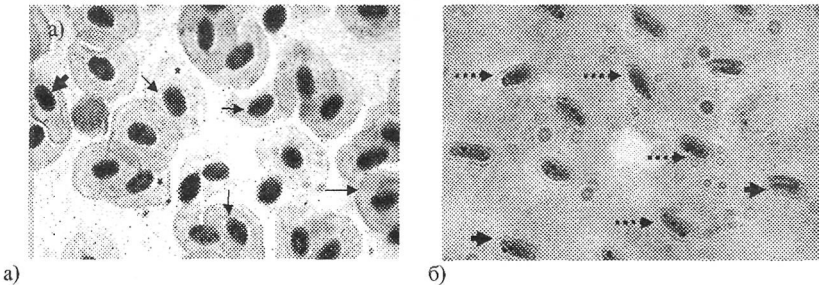


Рис. 3. Препарат окрашенных AgNO_3 эритроцитов диплоидной особи (а) и триплоидной особи (б) серебряного караса. Интенсивно окрашенные области в ядре эритроцита – ядрышки. Стрелками различной формы показаны ядра с одним (→) ядрышком, двумя (➡), тремя (***➡) ядрышками.

имеются значительные отличия. Так, в ядрах эритроцитов диплоидных особей количество ядрышек варьирует от 0 до 2. Соотношение количества ядер, в которых ядрышко не визуализируется, ядер с одним ядрышком и ядер с двумя ядрышками составляет около 10% : 60% : 30%, соответственно.

У некоторых диплоидных особей, относящихся как к первой, так и ко второй филогруппе мтДНК, наблюдается некоторое количество эритроцитов (до 5%), в ядрах которых визуализируются три ядрышка. Иное соотношение количества эритроцитов с различным содержанием ядрышек в ядрах наблюдается у триплоидных и тетраплоидных особей. У триплоидов соотношение клеток с одним, двумя и тремя ядрышками составило приблизительно 30% : 40% : 40%, соответственно, а у тетраплоидных особей это соотношение было смещено в сторону клеток с 3 и более ядрышками и составило около 10% : 30% : 40% : 20%, соответственно. Сравнение цитоморфологических особенностей показало, что для диплоидных особей, относящихся ко второй филогруппе, за очень небольшим исключением характерно отсутствие аномалий ядер эритроцитов (сегментированные ядра) при окрашивании азокармином G.

Иная картина наблюдается среди диплоидов и полиплоидов, относящихся к первой филогруппе мтДНК. При окрашивании серебром, у нескольких особей, относящихся к первой филогруппе, отмечалось 3-5% ядер эритроцитов с 3 ядрышками при размерах ядра, соответствующих диплоидам. На препаратах крови этих особей, окрашенных азокармином G, были выявлены аномалии ядер эритроцитов (сегментированные ядра). Чаще всего эритроциты с необычными ядрами и картина «деления» эритроцитов наблюдаются у триплоидных и тетраплоидных особей *Carassius auratus gibelio* в исследованных популяциях (рис. 4).

Различные авторы дают свою интерпретацию этих явлений. Так, Бенфи наблюдал аналогичную картину в эритроцитах автотриплоидных лососей, полученных в аквакультуре. Бенфи рассматривает эти отклонения от нормы, как свидетельство полиплоидии (автополиплоидии) (Benfey, 1999).

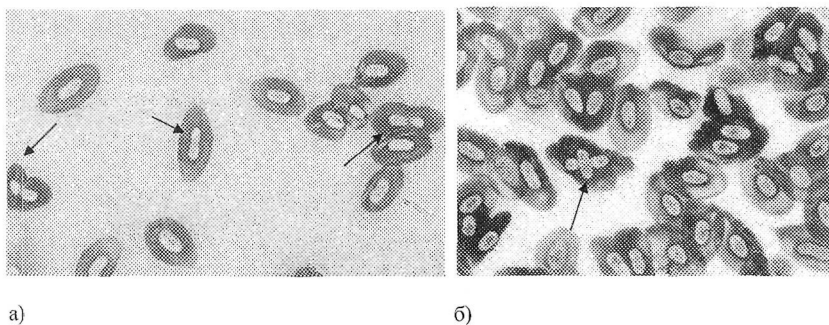


Рис.4. Эритроциты триплоидной особи серебряного карася. (Стрелкой отмечены клетки с сегментированными ядрами)

В работе китайских исследователей, проводивших генетический и цитологический анализ полученных ими в искусственных условиях гибридов серебряного карася (представителя подсемейства Cyprininae) и леща (представителя подсемейства Cultrinae), отмечена прямая зависимость между частотой аномальных эритроцитов и уровнем плоидности гибридов. Авторы рассматривают необычные эритроциты как маркерный признак гибридов (или аллополиплоидов) (Liu *et al.*, 2007).

По нашим данным, необычные эритроциты с сегментированными ядрами и количеством ядрышек более двух встречаются у серебряного карася не только у полиплоидных особей. Такие особенности встречаются также у диплоидных (по площади ядра) особей, имеющих мтДНК первой филогруппы, в отличие от обитающих вместе с ними (в тех же условиях) диплоидов со второй филогруппой мтДНК.

Эти наблюдения дают основание предположить, что особи серебряного карася, относящиеся к двум разным филогруппам мтДНК, участвуют в процессах гибридизации в разной степени. Необычная картина сегментированных ядер эритроцитов у гиногенетической полиплоидной формы серебряного карася может свидетельствовать также о гибридной природе последней в подтверждение выдвинутой ранее гипотезы о гибридизации, как начальном этапе образования полиплоидного вида (Ruiguang *et al.*, 1986; Dawly, 1989; Schultz, 1989; Vrijenhoek, 1994).

Распространение диплоидной и триплоидной формы и филогеография мтДНК серебряного карася в Евразии. Целью следующего этапа исследования было определение плоидности особей в выборках серебряного карася из водоемов Дальнего Востока, Средней Азии и европейской части России и сопоставление с данными по филогеографии этого вида на основе анализа мтДНК. Для идентификации филогрупп гаплотипов мтДНК, каждый из амплифицированных участков анализировался ограниченным набором рестрикционных ферментов. Для рестрикции участка ND3/ND4L/ND4 были использованы *MspI*, *MvaI*, *BsuRI* и *BstDEI*, для 12S/16S рРНК – *MspI*, *RsaI*. Результаты анализа двух фрагментов мтДНК каждой особи по всем сайтам и всем рестрикционным ферментам объединяли, получая, таким образом, комбинированные гаплотипы, каждый из которых обозначался одной буквой от А до I.

В таблице 1 приведены данные анализа уровней плоидности, соотношения полов и вариантов гаплотипов 380 исследованных особей в десяти выборках серебряного карася. В большинстве приморских популяций, в популяции о. Сахалин, р. Волга (Рыбинское водохранилище) и р. Сырдарья соотношение полов смещено в сторону преобладания самок, от более 75% в р. Сырдарья до 90% в оз. Ханка и Рыбинском водохранилище. Доля самцов в выборках из крупных речных систем юга Приморья – выборки р. Раздольная, р. Карасик и р. Лебединка – не превышает 31%. В двух выборках, оз. о-ва Большой Пелис и р. Камчатка, соотношение полов близко к 1:1 (табл. 1). В выборке р. Амур доля самцов составляет 17%, а в выборке оз. Ханка 10%. В выборках оз. Безымянное, о-ва Сахалин и бассейна р. Сырдарья самцы составляют 26% и 25%, соответственно. Наименьшая доля самцов выявлена в выборке Рыбинского водохранилища (9%).

В соотношении диплоидных и триплоидных особей в исследованных выборках *Carassius auratus gibelio* отмечаются существенные различия (табл. 1). В выборках из р. Раздольной, бассейна Амура (выборки оз. Ханка и р. Амур) и выборке р. Сырдарья преобладает триплоидная форма, где ее доля составляет 62%, 81% и 75%, соответственно. На Сахалине и на Камчатке серебряный карась представлен исключительно диплоидной формой. В выборке из бассейна р. Волга можно было ожидать преимущественно гиногенетическую (триплоидную) форму карася. Это следовало из полового состава выборки Рыбинского водохранилища с преобладанием самок. Тем не менее, цитофотометрический анализ показал, что количество диплоидных особей в исследованной популяции значительно и составляет около половины всех особей (табл. 1).

Филогеография мтДНК серебряного карася. ПЦР-ПДРФ анализ мтДНК десяти выборок серебряного карася подтвердил наличие двух ранее выявленных филогрупп, I-й и II-й. Различия между филогруппами при расчетах в данной работе оказались несколько больше, чем было обнаружено ранее в выборке р. Раздольной, – около 6% нуклеотидных замен (табл. 2, рис. 5б). Это обусловлено тем, что в данной работе мы использовали только информативные рестриктазы, которые дифференцируют гаплотипы. Сеть гаплотипов серебряного карася *Carassius auratus gibelio* также формирует две группы

Таблица 1

Соотношение полов, распределение филогрупп мтДНК и плоидности в различных популяциях серебряного караса

Выборка	число особей	соотношение полов (♀:♂)	соотношение филогрупп гаплотипов (I:II)	соотношение филогрупп гаплотипов у самок (I:II)	соотношение филогрупп гаплотипов у самцов (I:II)	соотношение диплоидов и триплоидов	соотношение филогрупп гаплотипов у диплоидов	соотношение филогрупп гаплотипов у триплоидов
1. р. Раздольная	52	2,3 : 1	3: 1	5: 1	1,3 : 1	0,6 : 1	1 : 2,4	все I
2. р. Карасик	64	2,2 : 1	2,6 : 1	4: 1	0,18 : 1	4 : 1	все II	все I
3. р. Лебединка	29	3,9 : 1	0,53 : 1	0,64 : 1	1 : 5	-	-	-
4. о. Б. Пелис	26	1:1	все II	все II	все II	-	-	-
5. р. Амур	29	4,8 : 1	все I	все I	все I	0,23 : 1	все I	все I
6. оз. Хавка	20	9:1	все I	все I	все I	1 : 3	все I	все I
7.оз. Безъмянное	50	3:1	0,1 : 1	0,1 : 1	все II	все 2n	1 : 30*	
8. р. Камчатка	57	1,3 : 1	все II	все II	все II	-	все II	-
9. р. Сырдарья	20	3:1	все I	все I	все I	0,25 : 1	все I	все I
10. Рыбинское водохранилище	33	10:1	все I	все I	все I	1,2 : 1	все I	все I

Примечание: В р. Карасик соотношение полов оценивалось в неселективной выборке.

В о. Большой Пелис и р. Лебединка плоидность не определялась.

* Плоидность определена для 31 особи.

гаплотипов, разделенных дистанцией в 10 нуклеотидных замен (рис. 5а). В одну группу входят гаплотипы А, С, D, E, F, G, H, I, а во вторую – гаплотип В. Максимальное расстояние, которое соответствует 10 нуклеотидным заменам, выявлено между гаплотипами В и G (рис. 5а). Гаплотипы, относящиеся к I-й филогруппе, характеризуются большим разнообразием (табл. 3, рис. 5а, б) по сравнению со II-й. Гаплотипическая изменчивость в первой филогруппе составила 0.2951 ± 0.0312 , нуклеотидная – 0.00231, по сравнению с нулевой изменчивостью во II-й филогруппе. Не исключено, что эти различия обусловлены разным давлением естественного отбора на варианты мтДНК гиногенетической и бисексуальной форм серебряного карася вследствие различий в типах размножения. Результаты географического распределения групп гаплотипов приведены на рисунках 6 и 7. Доли гаплотипов, относящихся к I-й и II-й филогруппам мтДНК,

Таблица 2

Матрица расстояний между гаплотипами А, В, С, D, E, F, G, H, I

A	B	C	D	E	F	G	H	I
0.0582	-							
0.0034	0.0615	-						
0.0140	0.0500	0.0174	-					
0.0353	0.0603	0.0385	0.0428	-				
0.0416	0.0584	0.0447	0.0491	0.0076	-			
0.0345	0.0409	0.0378	0.0421	0.0265	0.0257	-		
0.0076	0.0697	0.0108	0.0216	0.0178	0.0246	0.0460	-	
0.0035	0.0649	0.0068	0.0173	0.0430	0.0489	0.0416	0.0117	-

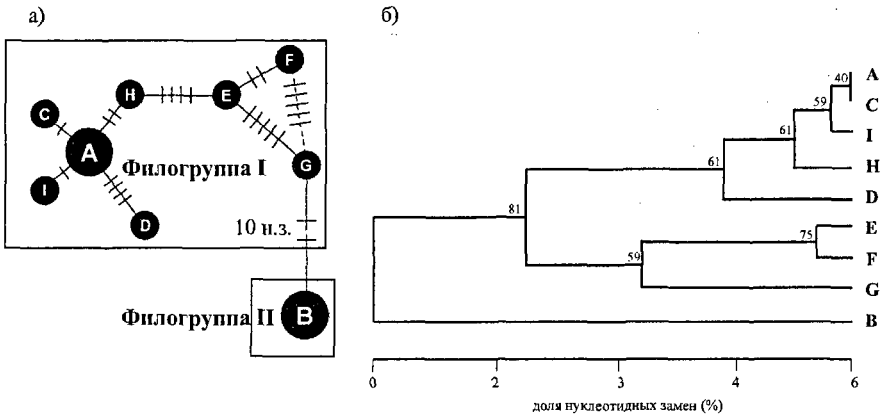


Рис. 5. а) Гаплотипическая сеть минимальной протяженности, показывающая материнские генеалогии мтДНК серебряного карася *Carassius auratus gibelio* б) UPGMA-дендрограмма гаплотипов мтДНК серебряного карася. А, С-I – гаплотипы I филогруппы, В – гаплотип II филогруппы.

Таблица 3

Встречаемость гаплотипов мтДНК серебряного карася в исследованных популяциях

Г-типы/№ выб.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	34(65.3)	28 (43.7)	3 (10.4)	0	29 (100)	18 (90)	3 (6.0)	0	16 (80.0)	31(93.9)
B	13(25.0)	25 (39.1)	19 (65.5)	26 (100)	0	0	47 (94.0)	57 (100)	0	0
C	4 (7.7)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	1(2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	11 (17.2)	7 (24.1)	0	0	1(5)	0	0	1 (5.0)	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (10.0)	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (5.0)	0
H	0	0	0	0	0	1(5)	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2(6.1)
Кол-во особей	52	64	29	26	29	20	50	57	20	33

В скобках приведены частоты. 1-10 – обозначения номеров выборок, как в таблице 1.

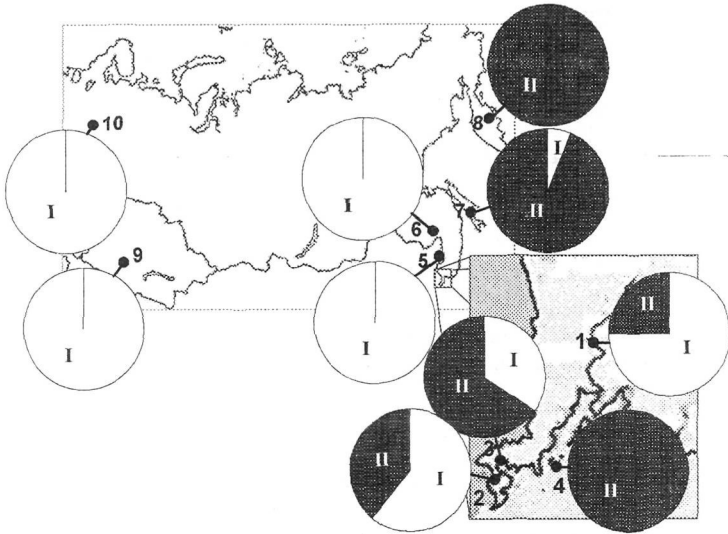


Рис.6. Географическое распределение и частоты филогрупп мтДНК в популяциях *Carassius auratus gibelio*. Белым обозначена первая филогруппа (I), черным цветом – вторая филогруппа (II). 1-10– обозначения номеров выборок, как в таблице 1.

значительно различаются в исследованных выборках. В выборках из бассейнов рек Раздольной и Тумангана (р. Карасик, р. Лебединка) присутствуют гаплотипы, относящиеся к обеим филогруппам, но в разных соотношениях (табл. 1, 3, рис. 6, 7). Так, в выборках из р. Раздольной и р. Карасик преобладают гаплотипы, относящиеся к филогруппе I, в то же время в выборке из р. Лебединка (приток Тумангана) – гаплотип филогруппы II. В выборках из бассейнов Амура, Сырдарьи и Волги все гаплотипы мтДНК принадлежат к филогруппе I, тогда как в выборках из озера о. Б. Пелис, и р. Камчатка все особи представлены гаплотипом филогруппы II. В выборке оз. Безымянное (Сахалин) подавляющее большинство особей (47 из 50) характеризуется гаплотипом, относящимся к филогруппе II (табл. 1, 3, рис. 6, 7).

Распределение филогрупп гаплотипов среди самцов и среди самок в выборках также варьирует (табл. 1). В р. Амур, оз. Ханка, р. Сырдарья и р. Волга все гаплотипы у обоих полов относятся к филогруппе I. В озере о. Большой Пелис и в р. Камчатка для всех особей характерен гаплотип филогруппы II. В выборке из оз. Безымянное на Сахалине лишь у 3-х самок из 35 обнаружены гаплотипы филогруппы I, остальные имеют гаплотип филогруппы II. Все самцы в этой выборке без исключения характеризуются гаплотипом из филогруппы II (табл. 1). В р. Раздольная доля гаплотипов из филогруппы I увеличена среди самцов и среди самок (табл. 1). В бассейне реки Туманган в одной из выборок (р. Карасик) у самок доминирует один из гаплотипов I-й филогруппы, в р. Лебединка обратное соотношение гаплотипов I-й и II-й филогрупп, но в обеих выборках значительно увеличена доля II-й филогруппы гаплотипов среди самцов (табл. 1).

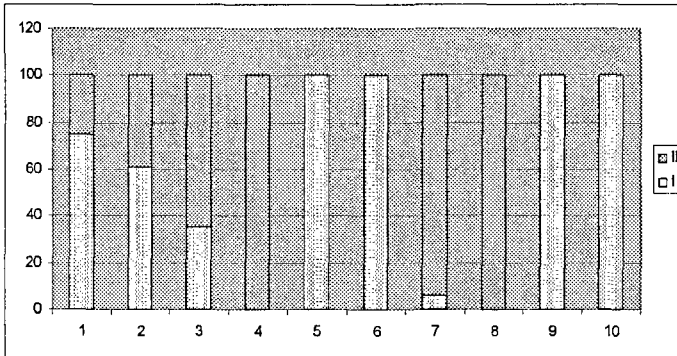


Рис. 7. Распределение филогрупп мтДНК в популяциях серебряного карася. 1-10 – обозначения номеров выборок, как в таблице 1.

Распределение филогрупп гаплотипов среди самцов и среди самок в выборках также варьирует (табл.1). В р. Амур, оз. Ханка, р. Сырдарья и р. Волга все гаплотипы у обоих полов относятся к филогруппе I. В озере о. Большой Пелис и в р. Камчатка для всех особей характерен гаплотип филогруппы II. В выборке из оз. Безымянное на Сахалине лишь у 3-х самок из 35 обнаружены гаплотипы филогруппы I, остальные имеют гаплотип филогруппы II. Все самцы в этой выборке без исключения характеризуются гаплотипом из филогруппы II (табл.1). В р. Суйфун доля гаплотипов из филогруппы I увеличена среди самцов и среди самок (табл.1). В бассейне реки Туманган в одной из выборок (р. Карасик) у самок доминирует один из гаплотипов I-й филогруппы, в р. Лебединка обратное соотношение гаплотипов I-й и II-й филогрупп, но в обеих выборках значительно увеличена доля II-й филогруппы гаплотипов среди самцов (табл. 1).

Соотношение гаплотипов среди диплоидных особей также различается в разных выборках (табл. 1). В большинстве выборок наблюдается полное преобладание одного из гаплотипов (табл. 1, 2). Так, гаплотип только I-й филогруппы характерен для диплоидных особей в оз. Ханка, реках Амур, Сырдарья и Волга; только II-я филогруппа характерна для диплоидных особей в р. Карасик (бассейн реки Туманган) и серебряных карасей популяции реки Камчатка.

В выборке оз. Безымянное о. Сахалин лишь одна диплоидная особь имеет гаплотип из филогруппы I, остальные относятся ко II-й филогруппе (табл. 1, 3). У двух других особей с таким гаплотипом пloidность не была определена, но, очевидно, они также диплоидные. Все триплоидные особи из всех выборок без исключения характеризовались гаплотипами мтДНК, относящимися к I-й филогруппе (табл. 1).

Тест на гетерогенность по частотам гаплотипов выявил высоко значимые различия при сравнении всех выборок ($d.f.=48$; $\chi^2=340$; $p \leq 0.001$). Естественно, что отсутствуют различия между популяциями, где обнаруживается только один вариант гаплотипа, либо присутствует небольшое количество уникальных гаплотипов. Отсутствуют различия между выборками Амур – Ханка – Сырдарья – Рыбинское водохранилище; а также выборками с Камчатки и о. Большой Пелис. Высоко значимые различия обнаруживаются по частотам гаплотипов при сравнении объединенных в группы диплоидных и триплоидных (полиплоидных) особей ($d.f.=6$; $\chi^2=138$; $p \leq 0.001$).

Таким образом, в результате исследования ploидности установлено, что не только в большинстве материковых популяций Дальнего Востока, но и в популяциях р.Сырдарья и Рыбинского водохранилища присутствуют две формы серебряного карася, диплоидная

гонохорическая и триплоидная гиногенетическая (табл. 1). Полученные данные находятся в противоречии с устоявшимися представлениями о том, что в европейской части преимущественно распространена гиногенетическая форма этого вида (Васильев, 1985; Головинская и др., 1965; Кирпичников, 1987). При этом показано, что доля самцов в популяции не прямо связана с долей диплоидных особей. Так, в Рыбинском водохранилище доля самцов в популяции мала (9%), в то время как доля диплоидов составляет около половины от всех исследованных особей (табл.1). Полученные результаты указывают на то, что доля диплоидной формы в европейской части России увеличилась. По-видимому, это общее явление, поскольку на увеличение доли бисексуальной формы указывают также и другие исследователи. За последние 20 лет в популяциях европейской части СНГ стало отмечаться устойчивое увеличение доли самцов серебряного караса. При определении плоидности особей из разных частей нижней части р. Дон доля диплоидной формы в 1989-1993 гг. был оценена в 89.7% от общей численности (Абраменко и др., 1997). Аналогичные изменения полового состава серебряного караса выявлены в низовьях Днестра и Дуная, отмечено появление самцов караса в водоемах бывшей Югославии, хотя ранее считалось, что здесь обитают лишь гиногенетические популяции (Абраменко и др., 1997). Предполагается, и имеются наблюдения, что при резких изменениях окружающей среды при клональном размножении однополюе формы из-за отсутствия генетической рекомбинации утрачивают свои преимущества при размножении, и их численность резко падает, при этом увеличивается доля гонохорической формы (Абраменко и др., 1997).

Неясным остается то, каким образом сосуществуют две формы караса, значительно различающихся по способу размножения. Часто предполагается, что они всегда присутствуют в популяциях, и при изменении экологической обстановки происходит смена доминирования форм. Тем не менее, симпатрическое сосуществование обеих форм и значительное морфологическое сходство (Васильева, Васильев, 2000) указывают на тесную генетическую связь между ними. Полученные данные по сравнению уровней плоидности и распределения филогрупп мтДНК в одной из дальневосточных популяций (р. Раздольной) позволили высказать предположения о механизме появления гиногенетической формы и о возможности генетического обмена между обеими формами.

Здесь необходимо отметить два аспекта. Первый связан с неясностью происхождения гиногенетической формы у этого вида (Murakami, Fujitani, 1997; Murakami *et al.*, 2001; Васильева, Васильев, 2000). Второй определяется неизвестностью механизма поддержания высокого морфологического и, по-видимому, генетического сходства между формами. В известных случаях появления триплоидных гиногенетических форм чаще всего обнаруживается аллотетраплоидизация (Darnell, Abramoff, 1968; Guo *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Rasch, Balsano, 1973a, 1973b; Schultz, 1980). В случае с серебряным карасем Васильева и Васильев рассматривают несколько возможных предковых форм при формировании гиногенетической формы, полагая маловероятным участие в этом процессе карпа *Cyprinus carpio* (Васильева, Васильев, 2000). Тем не менее, такая возможность подтверждается данными китайской группы исследователей (Liu *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2006). Они проводили гибридизацию обычного караса (*Carassius auratus* red var., $2n=100$) с карпом (*Cyprinus carpio*, $2n=100$) и поддерживали фертильных гибридных тетраплоидов ($4n=200$) на протяжении более чем 14 поколений. При этом скрещивание самцов такой тетраплоидной формы с диплоидной формой караса из Японии (*Carassius auratus cuvieri*) приводит к появлению жизнеспособной, но стерильной триплоидной формы (Guo *et al.*, 2006). Сходный механизм, возможно, лежал в основе появления триплоидной формы серебряного караса, получившей способность к гиногенетическому размножению. Однако прямых доказательств этому в настоящее время нет. В нашем исследовании анализ мтДНК всего лишь показал, что дивергенция форм караса произошла 1,25 – 2,5 млн. лет назад.

Анализ пloidности у карася на большей части ареала показал, что обе формы встречаются во всех исследованных материковых популяциях, в том числе в бассейнах р. Сырдарья и Волга. При сопоставлении пloidности у серебряного карася и присутствия той или иной филогруппы мтДНК на большом ареале (водоемы Дальнего Востока, Средней Азии и европейской части России) были выявлены некоторые закономерности. Показано, что в трех крупных речных системах Дальнего Востока (Раздольная, Туманган и Амур) обнаруживаются как диплоидная, так и трипloidная (гиногенетическая) формы карася. Также обе формы выявлены в бассейне р. Сырдарья и Волги. При этом в двух речных системах Приморья, Раздольной и Тумангана, обнаруживаются две филогруппы мтДНК (табл. 1, 3; рис. 6, 7), а в популяциях Амура, Сырдарьи и Рыбинского водохранилища – только одна филогруппа, характерная для гиногенетической формы. Отсутствие второй филогруппы мтДНК в западных популяциях, начиная с бассейна Амура (табл. 1, 3, рис. 6, 7) позволяет предположить историю возникновения и распространения форм серебряного карася. На основании присутствия обеих форм, бисексуальной и гиногенетической, а также наличия двух филогрупп мтДНК, следует предположить, что гиногенетическая форма возникла в дальневосточном регионе, и длительное время существовала в рефугии, в результате чего в митохондриальной ДНК накопились отличия от мтДНК бисексуальной формы. Таким образом, сформировались линии мтДНК, существенно отличающиеся друг от друга. Впоследствии, относительно недавно, в материковых популяциях произошел вторичный контакт между гиногенетической и диплоидной формами. Предположительно, местом такой рефугии могли быть Японские острова. Васильевы рассматривают японские подвиды серебряного карася как возможных предков гиногенетической формы (Васильева, Васильев, 2000). Причины, по которым в европейской и среднеазиатской популяциях серебряного карася вторая филогруппа мтДНК отсутствует, пока остаются не выясненными. При распространении карася на запад эта филогруппа могла исчезнуть в результате случайных причин или под влиянием отбора. Более вероятным нам представляется предположение, что в западном направлении распространялась только гиногенетическая форма, для которой характерна исключительно первая филогруппа мтДНК. Известно, что гиногенетическая форма при экспансии имеет преимущество из-за способа размножения (Абраменко и др., 1997; Васильева, Васильев, 2000; Гребельный, 2005). Тогда возникает закономерный вопрос, каким образом в популяциях гиногенетической формы появляются диплоидные особи? На рисунке 2 приводятся вероятные механизмы образования диплоидной формы из трипloidной. Если такой механизм возможен, то очевидно, что диплоидная форма в этих популяциях появляется в результате трансформации из гиногенетической, трипloidной. Соответственно, в этих популяциях отсутствует вторая филогруппа мтДНК. В пользу возможности такого механизма свидетельствуют некоторые экспериментальные данные (Liu *et al.*, 2006; Toth *et al.*, 2005), а также данные о появлении гонохорической формы серебряного карася даже в тех популяциях, где ранее фиксировалась исключительно гиногенетическая форма. Полученные нами данные также подтверждают существование такого процесса. Один из механизмов предполагает формирование диплоидной формы из трипloidной через тетрапloidную форму (рис. 2). В этом случае можно было ожидать выявления в популяциях, где встречаются обе формы, также и тетрапloidных особей. Действительно, в них обнаружено относительно большое количество особей, у которых пloidность определяется как $4n$ (5 из 20 в р. Сырдарья, 4 из 20 в оз. Ханка). Таким образом, этот факт подтверждает сделанное ранее предположение о существовании механизма перехода в природных популяциях трипloidной формы в диплоидную через тетрапloidную (рис. 2).

При сравнении пloidности и мтДНК в северо-восточных популяциях серебряного карася обнаруживаются другая закономерность. В сахалинской и камчатской выборках выявляется только диплоидная форма (табл. 1). При этом в сахалинской выборке для очень немногих особей характерно наличие гаплотипа филогруппы I, а в камчатской все

особи имеют гаплотипы филогруппы II (рис. 6, 7). В популяции о. Большой Пелис не удалось определить ploidy. Тем не менее, наличие только одной II-ой филогруппы мтДНК и равное соотношение полов с очевидностью указывает, что в этой популяции все особи диплоидные (бисексуальные). Следует отметить, что сахалинская популяция и популяция озера на острове Большой Пелис имеют естественное происхождение. Камчатская же популяция сформировалась в результате искусственной интродукции серебряного карася в различные участки р. Камчатка в 30-е годы прошлого века, и в настоящее время этот вид естественным образом распространяется на север (Бугасв и др., 2007).

Почему и какие факторы определяют то, что при распространении карася в западном направлении преобладающая форма была представлена гиногенетическими особями, а в северо-восточном – бисексуальными, определить сложно. Для интродуцированной популяции карася можно предположить, что это определялось полным отсутствием до недавнего времени в камчатских водоемах других пресноводных видов карповых рыб, сперма которых необходима для активации развития яйцеклеток гиногенетической формы карася. Но в водоемах Сахалина совместно с карасем обитают другие виды карповых. Представляется вероятным, что по каким-то причинам при распространении на северо-восток более адаптивной оказалась бисексуальная форма серебряного карася.

Сравнительный анализ мтДНК серебряного карася *Carassius auratus gibelio*, золотого карася *Carassius carassius* и карпа *Cyprinus carpio*. Установлению бесполого способа размножения часто предшествует процесс гибридизации между видами (Ruiguang et al., 1986; Dawly, 1989; Schultz, 1989; Vrijenhoek, 1994; Гребельный, 2005). Существует предположение, что роды *Carassius* и *Cyprinus* произошли от единого тетраплоидного предка, и со временем у большинства видов геномы стабилизировались в диплоидном состоянии (Schultz, 1980). При этом вопрос о предковых формах серебряного карася пока остается открытым (Murakami, Fujitani, 1997; Murakami et al., 2001; Васильева, Васильев, 2000). Также остается неизвестным, один вид или два вида участвовали в формировании поддиплоидной гиногенетической формы серебряного карася (Черфас, 1987; Fan, Shen, 1990; Fan, Liu, 1990).

С целью прояснения филогенетических взаимоотношений был проведен сравнительный анализ изменчивости мтДНК обеих форм серебряного карася *Carassius auratus gibelio*, мтДНК золотого карася *Carassius carassius* и мтДНК карпа *Cyprinus carpio*. Анализ мтДНК позволяет совершенно определенно идентифицировать по крайней мере один из видов, участвовавших в гибридизации. Для этого были проанализированы мтДНК трех особей сазана *Cyprinus carpio*, (р. Амур), двух самок золотого карася *Carassius carassius* (р. Волга), а также мтДНК особей серебряного карася, представляющих каждый из обнаруженных ранее гаплотипов (А, В, С, Е, F, G, H, I).

Для более точного определения филогенетических отношений исследуемых рыб методом ПЦР-ПДРФ было увеличено количество использованных рестрикционных эндонуклеаз. Как видно из данных, представленных в таблице 4 и на рисунке 8, варианты мтДНК обеих филогрупп серебряного карася формируют отдельный кластер. МтДНК золотого карася отличается от них примерно 6% нуклеотидных замен (от 5.4% между гаплотипами J и H, до 6.7% между гаплотипами J и G). Основные гаплотипы (А и В), составляющие две филогруппы мтДНК серебряного карася, равноудалены от мтДНК золотого карася (6% нуклеотидных замен). Расстояние между гаплотипом J мтДНК золотого карася и гаплотипами K, L, M мтДНК карпа варьирует от 6.7% до 6.9% нуклеотидных замен (около 7% нуклеотидных замен). Вторая филогруппа мтДНК, представляющая только бисексуальную форму серебряного карася *Carassius auratus gibelio* равноудалена от мтДНК золотого карася и карпа – расстояние между ними составляет около 6% нуклеотидных замен (табл. 4).

Таблица 4

Матрица расстояний между гаплотипами А, В, С, Е, F, G, Н, I, J, K, L, М

	А	В	С	Е	F	G	Н	I	J	K	L	М
-												
0.0284	-											
0.0015	0.0299	-										
0.0206	0.0293	0.0220	-									
0.0198	0.0287	0.0212	0.0032	-								
0.0125	0.0313	0.0140	0.0168	0.0161	-							
0.0048	0.0350	0.0063	0.0149	0.0181	0.0174	-						
0.0030	0.0316	0.0045	0.0206	0.0197	0.0122	0.0080	-					
0.0599	0.0596	0.0613	0.0540	0.0569	0.0674	0.0538	0.0632	-				
0.0757	0.0586	0.0771	0.0684	0.0716	0.0743	0.0739	0.0740	0.0675	-			
0.0773	0.0601	0.0787	0.0699	0.0731	0.0758	0.0755	0.0756	0.0689	0.0015	-		
0.0771	0.0602	0.0786	0.0700	0.0731	0.0757	0.0754	0.0754	0.0691	0.0015	0.0030	-	

Примечание. Гаплотипы *Carassius auratus gibelio*: I филогруппа – А, С, Е, F, G, Н, I; II филогруппа – В; *Carassius carassius*: J; *Cyprinus carpio*: K, L, М.

Примечательно, что основные гаплотипы (А и В) двух филогрупп мтДНК серебряного карася имеют различия в расстоянии с гаплотипами мтДНК карпа. Так, между гаплотипом А и гаплотипами карпа расстояние варьирует в пределах 7.6-7.7% нуклеотидных замен (около 8%), а расстояние между гаплотипом В и гаплотипами К, L, М мтДНК карпа сопоставимо с расстоянием между В и гаплотипом мтДНК золотого карася и составляет 5.9-6% нуклеотидных замен. Из данных, представленных в таблице 4, видно, что вторая филогруппа мтДНК, представляющая только бисексуальную форму серебряного карася *Carassius auratus gibelio* равноудалена от мтДНК золотого карася и карпа. При этом основной гаплотип «гиногенетической» филогруппы мтДНК серебряного карася отстоит от мтДНК карпа значительно (почти на 2%) дальше, чем гаплотип В (табл. 4). Таким образом, этот факт подтверждает, что гаплотип, представляющий вторую филогруппу мтДНК и распространенный только на Дальнем Востоке, появился раньше, чем гаплотип А, характерный для гиногенетической формы. Из данных также видно, что между золотым и серебряным карасями обнаруживается большее генетическое родство по мтДНК, и они представляют собой по отношению к карпу монофилетическую группу.

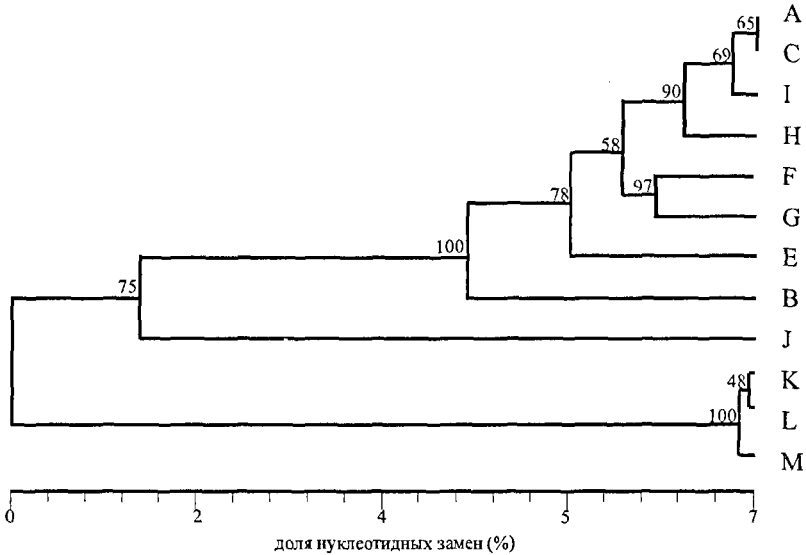


Рис. 8. UPGMA-дендрограмма гаплотипов мтДНК серебряного карася, золотого карася и карпа.

А, С-І – гаплотипы I филогруппы, В – гаплотип II филогруппы *Carassius auratus gibelio*, J – гаплотип золотого карася *Carassius carassius*, К, L, М – гаплотипы карпа *Cyprinus carpio*.

Митохондриальные линии обоих видов карасей примерно равноудалены от мтДНК карпа: 6-8% нуклеотидных замен составляет расстояние между гаплотипами мтДНК серебряного карася и карпа, 7% нуклеотидных замен между мтДНК золотого карася и карпа (табл. 3). Поэтому можно предполагать, что предковая форма золотого и серебряного карасей дивергировала на два вида после отделения от общего предка с карпом. Очевидно также большее генетическое сходство между двумя формами серебряного карася по отношению к золотому и карпу. В то же время полученные данные не дают однозначного ответа на вопрос: могли ли другие виды, золотой карась или карп, участвовать в образовании полиплоидной формы гиногенетической формы серебряного карася. Причина этого лежит в особенности наследования мтДНК только по материнской линии. Остается правомочность допущения, что при гибридизации и образовании гиногенетической формы со стороны серебряного карася в этом процессе могли участвовать только самки. Процесс гибридизации с односторонним переносом мтДНК только от одного вида к гибридной форме известен среди рыб (Hubbs, Hubbs, 1946a). Поэтому для решения этого вопроса необходимо сравнительное исследование ядерных генов, которые приходят к гибридной форме от обоих родителей.

ВЫВОДЫ

1. В популяциях серебряного карася *Carassius auratus gibelio*, представленного симпатрически обитающими формами, различающимися уровнем пloidности и способом размножения (гонохорические диплоидные и гиногенетические триплоидные), выявлены две филогруппы мтДНК, отличающиеся 2,5% нуклеотидной дивергенции.
2. У триплоидных гиногенетических особей серебряного карася встречается только одна из филогрупп мтДНК (I), в то время как у диплоидных особей встречаются обе филогруппы (I и II). Вторая филогруппа мтДНК (II), отсутствующая у гиногенетических особей, обнаружена только на территории Дальнего Востока. Это свидетельствует о том, что данный регион является местом дивергенции бисексуальной и гиногенетической форм.
3. Симпатрическое существование и морфологическое сходство двух форм серебряного карася предполагает, что между бисексуальной и гиногенетической формой может происходить генетический обмен. Особенности встречаемости филогрупп мтДНК дают основания полагать, что этот процесс является однонаправленным и обусловлен существованием механизма трансформации триплоидной гиногенетической формы в диплоидную бисексуальную форму.
4. Существование в европейской и среднеазиатской популяциях серебряного карася диплоидных и триплоидных особей, но наличие только одной филогруппы мтДНК (I), подтверждает возможность однонаправленной трансформации гиногенетической формы в бисексуальную.
5. В северо-восточных популяциях Дальнего Востока выявляется только диплоидная форма и преимущественно вторая филогруппа мтДНК (II), характерная только для бисексуальной формы. Это также свидетельствует об однонаправленности процесса трансформации гиногенетической формы серебряного карася в бисексуальную.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Брыков Вл.А., Апаликова О.В., Елисейкина М.Г., Ковалев М.Ю. Изменчивость митохондриальной ДНК у диплоидной и триплоидной форм серебряного караса *Carassius auratus gibelio* // Генетика. 2005. Т. 41, № 6. С. 811-816.
1. Апаликова О.В. Филогенетический анализ двух форм серебряного караса *Carassius auratus gibelio* Bloch в дальневосточных водоемах // Материалы конференции «Современные проблемы биологической эволюции» к 100-летию Государственного Дарвиновского музея. 17-20 сентября 2007, Москва. М.: Изд-во ГДМ, 2007. С. 96-97.
2. Апаликова О.В., Елисейкина М.Г., Ковалев М.Ю., Брыков Вл.А. Сопоставление уровней плоидности и филогенетических линий митохондриальной ДНК у серебряного караса из популяций Дальнего Востока и Средней Азии // Генетика. 2008. Т. 44, № 7. С. 1000-1008.
3. Апаликова О.В. Филогеография плоидности и митохондриальной ДНК у серебряного караса *Carassius auratus gibelio* в популяциях Евразии. Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып.4. Владивосток: Дальнаука, 2008. – С. 398-397.
5. Апаликова О.В., Елисейкина М.Г., Брыков Вл.А. Цитометрический анализ и цитоморфологические особенности диплоидных и полиплоидных особей в смешанных природных популяциях серебряного караса *Carassius auratus gibelio* Bloch// Материалы международной конференции «Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб». 10-12 сентября 2008, Санкт-Петербург: Изд-во ГосНИОРХ, 2008. С. 30-31.

Ольга Владимировна
Апаликова

Филогенетический анализ двух форм серебряного карася
Carassius auratus gibelio Bloch на основе изменчивости
митохондриальной ДНК

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 07.10.2008 г. Формат 60х90/16. 1 уч.-изд. л.
Тираж 100 экз. Заказ № 103.
Отпечатано в типографии издательского центра ФГУП «ТИНРО-Центр»
г. Владивосток, ул. Западная, 10