

УДК 575.591:599.9

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ УГЛОЗУБА ШРЕНКА (*Salamandrella schrenckii*) ПО ДАННЫМ ОБ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

© 2009 г. Б. А. Мальярчук<sup>1\*</sup>, М. В. Деренко<sup>1</sup>, Д. И. Берман<sup>1</sup>, Т. Гржибовский<sup>2</sup>,  
Н. А. Булахова<sup>3</sup>, А. П. Крюков<sup>4</sup>, А. Н. Лейрих<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, 685000

<sup>2</sup>Институт судебной медицины, Медицинская академия им. Л. Рыдыгера, Быдгощ 85-094, Польша

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета, Томск, 634050

<sup>4</sup>Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690022

Поступила в редакцию 10.04.2008 г.

Принята к печати 03.07.2008 г.

Получены данные об изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК (мтДНК) углозуба Шренка, *Salamandrella schrenckii* (Strauch, 1870) из популяций Приморского и Хабаровского краев. С помощью филогенетического анализа обнаружено два кластера гаплотипов – “южный” кластер 1 и “северный” кластер 2, значение дивергенции между которыми составляет 3%. Результаты анализа изменчивости мтДНК и аминокислотных последовательностей цитохрома *b* позволяют предположить, что освоение современного ареала углозуба Шренка произошло с юга на север Приморья. Обнаружено, что “северный” кластер в отличие от “южного” проявляет все признаки демографической экспансии, а именно – унимодальный характер распределения попарных нуклеотидных различий, результаты тестов на селективную нейтральность изменчивости мтДНК и соответствие генетических показателей ожиданиям моделей демографической экспансии.

**Ключевые слова:** митохондриальная ДНК, цитохром *b*, молекулярная эволюция, криптические виды.

GENETIC STRUCTURE OF POPULATIONS OF SCHRENCK NEWT (*Salamandrella schrenckii*) BASED ON MITOCHONDRIAL DNA CYTOCHROME *b* VARIABILITY DATA, by B. A. Malyarchuk<sup>1\*</sup>, M. V. Derenko<sup>1</sup>, D. I. Berman<sup>1</sup>, T. Grzybowski<sup>2</sup>, N. A. Bulakhova<sup>3</sup>, A. P. Kryukov<sup>4</sup>, A. N. Lejrikh<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Institute of Biological Problems of North, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia; \*e-mail: malyarchuk@ibpn.ru; <sup>2</sup>Forensic Medicine Institute, Ludwik Rydygier Medical College, 85–094 Bydgoszcz, Poland; <sup>3</sup>Institute of Biology and Biophysics Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia; <sup>4</sup>Institute of Biology and Soil Sciences, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia). Data on variability of nucleotide sequences of mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome *b* gene of Schrenck newt, *Salamandrella schrenckii* (Strauch, 1870), from populations of Primorie and Khabarovsk regions have been received. By means of phylogenetic analysis, two clusters of haplotypes – 'southern' cluster 1 and 'northern' cluster 2, with divergence level between them estimated as 3% – were revealed. Results of analysis of mtDNA and cytochrome *b* amino acid variation allow us to assume that development of a modern area of Schrenck newt occurred from the south on the north of Primorie region. It was found that 'northern' cluster in contrast to the 'southern' one demonstrates all signs of demographic expansion (i.e., unimodal type of pairwise nucleotide differences, results of tests of selective neutrality of mtDNA variation and good correspondence of genetic parameters to expectations following from the models of demographic expansions).

**Key words:** mitochondrial DNA, cytochrome *b*, molecular evolution, cryptic species.

Молекулярно-генетические исследования, позволяющие обнаруживать криптические виды, являются важным направлением эволюционной биоло-

гии, поскольку никакими другими методами реконструировать историю их формирования не представляется возможным. Ранее с помощью анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* митохондриальной

\* Эл. почта: malyarchuk@ibpn.ru

ДНК (мтДНК) в составе широкоареального вида амфибий – сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870) – нами обнаружен новый криптический вид – углозуб Шренка (*Salamandrella schrenckii* Strauch, 1870), который обитает в Приморском и Хабаровском краях [1]. Популяции юго-востока России генетически резко выделялись на почти гомогенном фоне сибирского углозуба из различных регионов Северной Евразии, что указывало на возможность существования большого внутривидового разнообразия углозуба Шренка. В то время мы располагали лишь немногими сведениями о его распространении: он был известен только на юге Приморского и Хабаровского краев. Из полученных молекулярных данных следовало, что углозуб Шренка существенно древнее сибирского углозуба (2.5 и 0.49 млн. лет соответственно). Более того, углозубы этого вида распределялись на два субкластера, степень дивергенции между которыми оценивалась, в среднем, в 3.2% [1].

Для определения границ ареала углозуба Шренка нами проведены широкомасштабные полевые исследования, в ходе которых собрана коллекция биологического материала от углозубов, обитающих в Приморье, Хабаровском крае и сопредельных территориях. Анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* мтДНК позволил идентифицировать углозуба Шренка в собранном коллекционном материале. Таким образом, целью настоящей работы является изучение внутривидовой структуры и особенностей молекулярной эволюции углозуба Шренка – нового вида позвоночного животного фауны России.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материал для данного исследования собран** во время полевых работ 2004–2007 гг. более чем в 65 пунктах на территории Амурской и Еврейской автономных областей, Приморского и Хабаровского краев; в 35 из них выявлен углозуб Шренка (рис. 1). Геномную ДНК выделяли из различных тканей взрослых животных, личинок и эмбрионов, замороженных или фиксированных в 70% спирте. Амплифицировали два участка гена цитохрома *b*, используя праймеры MVZ15L/MVZ18H и MVZ25L/ControlWH, как описано нами ранее [1]. ДНК секвенировали с помощью генетического анализатора ABI 3130 с использованием набора для геномного секвенирования BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”) и праймеров MVZ15L и MVZ25L. Для выравнивания и анализа полученных последовательностей применяли пакет программ SeqScape v. 2.5 (“Applied Biosystems”). Генетические дистанции ( $\rho$ -дистанции) между индивидуальными последовательностями ДНК рассчитывали, исходя из количества нуклеотидных замен на позицию при попарных сравнениях. Для оценки времени дивергенции и эволюцион-

ного возраста линий мтДНК использовали число мутаций в гене цитохрома *b*, полагая, что величина, равная 0.77% дивергенции (для транзиций и трансверсий) соответствует скорости изменений за 1 млн. лет [2].

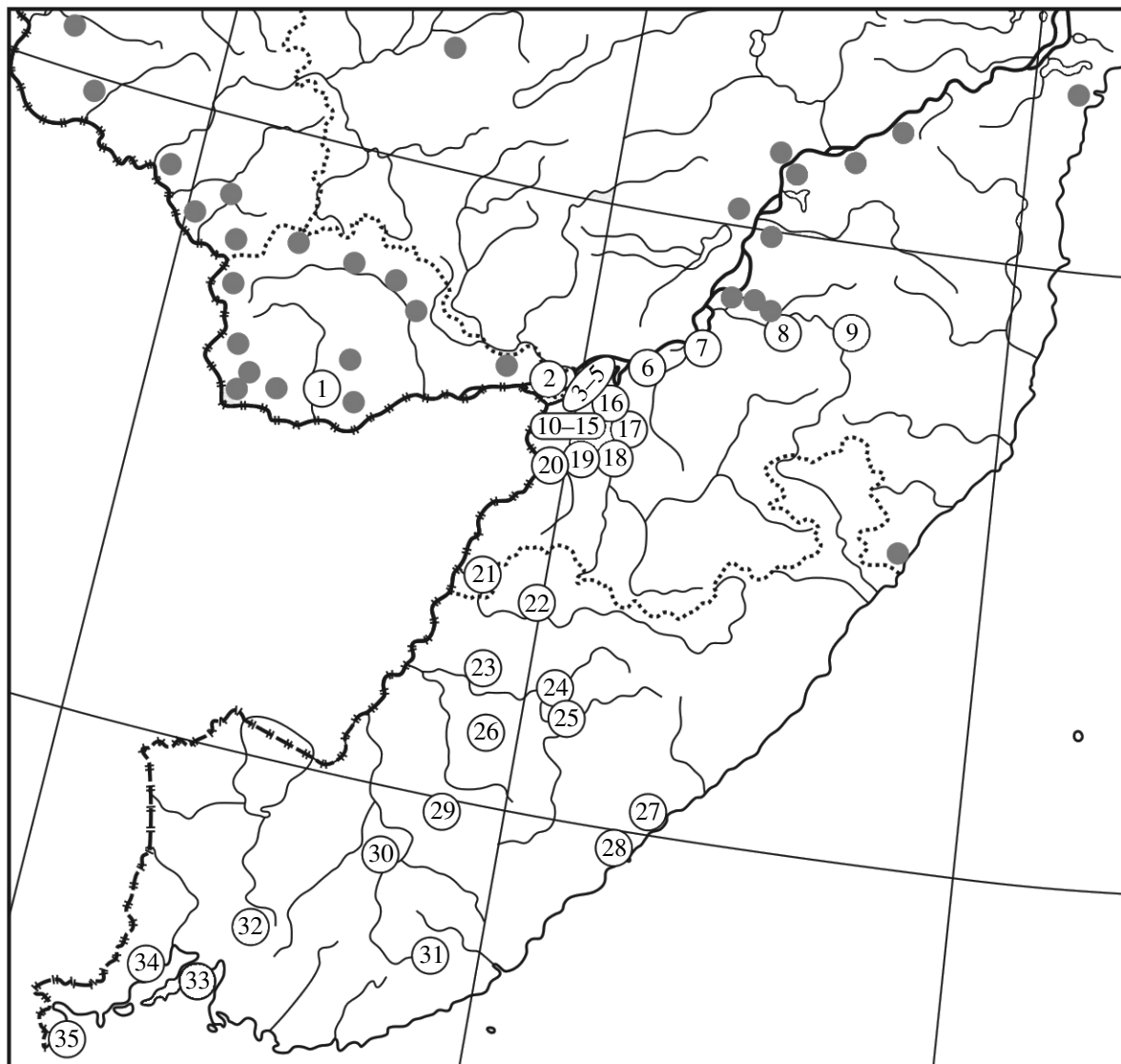
Филогенетические деревья построены с применением алгоритмов NJ (Neighbour-Joining, метод ближайшего соседа) [3], UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages, невзвешенный парногрупповой метод) и MP (Maximum Parsimony, метод максимальной экономии) [4]. Для построения филогенетических деревьев использовали пакеты филогенетических программ MEGA 2.1 [5] и Network 4.5 [6]. Для построения медианных сетей применяли алгоритм MJ (Median-Joining) (пакет программ Network 4.5). Для поиска наиболее оптимальных деревьев использовали опцию “MP Calculation”. Степень дивергенции мтДНК оценивали с помощью дистанции  $\rho$ , которая соответствует среднему расстоянию от предкового гаплотипа ко всем производным гаплотипам, включая гипотетические (так называемые медианные векторы) [6].

**Разнообразие и степень дивергенции мтДНК**, а также демографические показатели, характеризующие эффективный размер и динамику численности популяции, рассчитывали с помощью программ пакета Arlequin 3.01 [7]. Для оценки степени межпопуляционной дифференциации использовали коэффициент  $F_{ST}$ , рассчитанный с помощью анализа молекулярной изменчивости AMOVA (пакет Arlequin 3.01).

**Для тестирования гипотезы** молекулярных часов использовали тест Таджимы (Tajima) [8], оценивающий скорость эволюции в парах последовательностей ДНК относительно ДНК внешней группы (пакет программ MEGA 2.1). В качестве внешней группы использовали нуклеотидные последовательности гена цитохрома *b* лягушкозуба семиреченского *Ranodon sibiricus* (Acc. N NC 004021). Для сравнительного анализа привлечены данные из GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)) по нуклеотидным последовательностям гена цитохрома *b* (участок длиной 743 п.н.) представителей различных родов семейства Hynobiidae. Нуклеотидные последовательности изученного в настоящей работе участка гена цитохрома *b* углозубов Шренка помещены в базу данных (GenBank, Acc. NN EU567390-EU567451).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нуклеотидные последовательности участка длиной 825 п.н. между позициями 14228 и 15322 (согласно нумерации нуклеотидов полного митохондриального генома *Salamandrella keyserlingii* [9]) гена цитохрома *b* мтДНК определены у 167 особей углозуба Шренка из различных районов



**Рис. 1.** Карта-схема мест сбора биологических образцов от углозубов Шренка. Точки сбора: 1, 2 – Хабаровский край, Еврейская автономная область; 3–20 – Хабаровский край; 21–35 – Приморский край. Серым цветом отмечены точки сбора, в которых углозуб Шренка не выявлен.

Приморья и Хабаровского края. В исследованной выборке обнаружено 62 гаплотипа гена цитохрома *b*, которые определяются полиморфизмом в 94 позициях мтДНК, 53 из которых филогенетически информативны (т.е. отмечены более чем в одном гаплотипе мтДНК) (рис. 2). Большинство мутаций (86) составляют транзиции, трансверсии выявлены лишь в 11 позициях. Мутации в 10 позициях приводят к заменам аминокислот, но из них лишь три являются информативными. Таким образом, большинство мутаций синонимичны. Нуклеотидный состав исследованного участка мтДНК углозубов характеризуется смещением в сторону тимина и аденина (33.5 и 28.1% соответственно) относительно остатков цитозина и гуанина (23.9 и 14.5% соответственно), что свой-

ственно митохондриальным геномам животных в целом [10].

Наиболее частыми в исследованных выборках углозубов являются гаплотипы V11 и V146, обнаруженные у 23 и 12 особей соответственно (см. рис. 2). Между тем, более 50% гаплотипов (34) зарегистрированы лишь в единичных случаях. Результаты филогенетического анализа гаплотипов гена цитохрома *b* показали, что имеется два отчетливо выраженных кластера, характеризующихся высокой бутстреп-поддержкой: 97% для кластера 1 и 82% для кластера 2 (рис. 3). Такая топология филогенетического дерева сохраняется при использовании различных алгоритмов анализа (NJ, UPGMA и MP, включая MJ-анализ), что свидетельствует о высокой достоверности полученного результата

	111111111	1111112222	2222223333	3333333333	4444444555	5555566666	6666666667	7777777777	7777888	
	133445677	9000123456	6789990345	6778899022	3444556778	3344889223	4566600111	3334466661	1334556667	7888002
	6047692103	7349879516	9070392270	5470625123	5136581362	6945470469	4023545036	1470314785	6395580395	8147580
#V11 (23)	ACTTATCGTC	TAACACACTC	AGTATAAACC	TATCTTAGAG	CAAATACCAG	CAACTGTTCC	ACACATTACG	TCACCCACCT	TCTTCGGTTC	AAGGTTT
#V12 (8)	...C...A..	...T...T	.....T..	.G....A..	T....T.A	T..T...T.	GT..GC.GTA	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V13 (2)	...C...A..	...T...T..T	.....T..	.....A..	T....T.A	T..T...T.	GT..GC.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V14 (1)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	...G...T..	.....T..	GT.....T..	.....T..	.T..CT.A..	.....
#V15 (3)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	...G.G...	.....T..	T.....TG...	.....T..	.T..T.A..	.....C
#V16 (2)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	.....T..	.....T..	.....T..	.....T..	.....A..	.....
#V17 (6)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	.....T..	.....T..	.....T..	.....T..	.....T..	.....
#V18 (2)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	.....T..	.....T..	.....C..	.....T..	.....T..	.....
#V19 (1)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	...G....	.....T..	.T.....T..C	.....T..	.T..T.A..	.....
#V110 (7)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	...G....	.....T..	.TT.....T..	.....T..	.T..T.A..	.....
#V111 (2)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	.....T..	.....T..	.....C..	.....T..	.T..T..	.....
#V112 (1)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	.....T..	.....T..	.....T..	.....T..	.....T..	.....
#V113 (7)	.T.....T..	.....T..	.....T..	.....A	.....T..	.....T..	.....T..	.....T..	.....T..	.....
#V114 (2)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	.....T..	.....T..	.....A..	.....T..	.....T..	.....
#V115 (2)	.....T..	.....T..	.....T..	.....A	.....T..	.....T..	.....A..	.....T..	.....T..	.....
#V116 (3)	G..C..TA..	..G....T	.....T..	.....A	T...C.T.A	T..T..C.T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V117 (1)	G..C..TA..	.....T	.....G...	.....A	T.....A	T..TC..T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	.CA...A
#V118 (1)	...C..TA.T	.....T	.....T	.....CGA..	T.....T.A	T..T...T.	GT..CC.G..	.....T....	.TC.T.A..T	G.AA...A
#V119 (2)	...C..TA..	..G....T	.....T..	.....A	T...C.T.A	T..T..C.T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V120 (1)	.....A	.....T..T	.....T..	.....A	T.....T.A	T..T...T.	GT..C.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V121 (1)	...C...A..	.....T..T	.....T..	.....T..A	T.....T.A	T..T...T.	GT..GC.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V122 (1)	...C...A..	.....T..T	.....T..	.....AG	T.....T.A	T..T...T.	GT..GC.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V123 (1)	...C..TA..	.....T	.....T	C...G..A	T.....T.A	T..TC..T	GT..GC.G..	.....TT...	.T..T.A..T	.CA...A
#V124 (1)	...C..TA..	.....T	.....G...	.....A	T.....T.A	T..TC..T	GT..GCCG..	.....T....	.T..T.A..T	.CA...A
#V125 (8)	...C..TA..	..G....T	.....T..	.....A	T...T..A	T..T..C.TA	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V126 (1)	...C..TA..	.....T	.....T	.....A	T...T..A	T..GTC..T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	.CA...A
#V127 (2)	...C...A..	A...G..T	T.....T..	.....A	T...T..A	T..T...T.	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..CT	G.A..AA
#V128 (3)	...C...A..	A...G..T	T.....T..	.....A	T...T..A	T..T...T.	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	G.A..AA
#V129 (1)	...C...A..	.....T..T	.....G..	.G....A	T...T..A	T..T...T.	GT...C.GT.	.....?????	???????????	?????????
#V130 (2)	...C..TA..	.....T	.....G...	.....A	T...T..A	T..TC..T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	.CA...A
#V131 (1)	...C...A..	.....T..T	.....T..	.....A	T.G...T.A	T..T...T.	GT...C.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V132 (1)	...C...A..	.....T..T	.....T..	.G....A	T...T..A	T..T...T.	GT...C.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V133 (1)	...C...A..	.....T..T	..T.....	.C....A	T...T..A	T..T.A..T	GT..GC.G..	C...T....	.T..T.A..CT	G.AA...A
#V134 (1)	...C...A..	.....T..T	.A.....	.....A	T...T..A	T..T...T.	GT..GC.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G....A
#V135 (1)	...C...A..	.....T..T	.....T..	.....A	T...T..A	TG.T...T.	GT...C.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V136 (2)	...C..TA..	..G....T	..T.....	.....A	T...T..A	T..T..C.T	GT..GC.G..	.....T.T...	.T..T.A..T	G.A...A
#V137 (1)	...C..CTA..	.....T	.....T	.....A	T...T..A	T..TC..T	GT..GC.G..	.....TT...	.T..T.A..T	.CA...A
#V138 (1)	...C..TA..	.....T	.C.....	.....A	T...T..A	T..TC..T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	.CA...A
#V139 (1)	...C..TA..	.....CT	.....T	.....A	T...T..A	T..TC..T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	.CA...A
#V140 (2)	...C..TA..	.....T	.....T	.....A	T...T..A	T..TC..T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	.CA...A
#V141 (4)	...C...A..	G...T..T	..T.....	.C....A	T...T..A	T..T.A..T	GT..GC.G..	C...T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V142 (1)	...C...A..	.....T..T	.....T..	.....A	T...T..A	TG.T...T.	GT...C.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V143 (1)	...C...A..	.....G..T	T.....T..	.....A	TG...T.A	T..T...T.	GT..GC.G..	.....?????	???????????	?????????
#V144 (1)	...C...A..	.....G..T	T.....T..	.....A	T...TA.A	T..T...T.	GT..GC.G..	.....?????	???????????	?????????
#V145 (4)	...C...A..	.....G..T	T.....G..	.....A	T...T..A	T..T...T.	GT..GC.G..	.....T....	.TC.T.A..T	G....A
#V146 (12)	...C...A..	.....G..T	T.....T..	.....A	T...T..A	T..T...T.	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V147 (1)	...C...AC	.....G..T	T.....T..	.....A	T...T..A	T..T...T.	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V148 (2)	??...T..	.....T	.....T	.....A	T...T..	.....T	.T.....T..	.....T....	.T..T.A..	.....
#V149 (1)	??CC...A..	.....T..T	..TC..T	.C....A	T...T..A	T..T.A..T	GT..GC.G..	C...T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V150 (1)	??...T..	..G....T	.....T	.....A	.....T..	.....T	.T.....T..	.....T....	.T..T.A..	.....
#V151 (4)	??..CG.TA..	..G....T	.....T	.....A	T...T..A	T..T..C.T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V152 (6)	??...T..	.....T	.....T	.....A	...G....	.....T	GT.....T..	.....T....	.T..T.A..	.....
#V153 (1)	??...T..	.....T	.....T	.G....A	...G....	.....T	GT.....T..	.....T....	.T..T.A..	.....
#V154 (1)	??...T..	.....T	.....T	.....A	.....T..	.....T	.....T..C	.....T....	.T..T.A..	.....
#V155 (9)	??...T..	.....T	.....T	.....A	.....T..	.....T	.T.....T..	.....T....	.T..T.A..	.....
#V156 (1)	??...T..	.....T	.....T	.....A	.....T..	.....T	.T.....T..	.....T....	.T..T.A..	.....
#V157 (2)	??..C...A..	.....T..T	.....T..	.....A	T...T..	T..T...T.	GT..GC.G..	.....T....	CT..T.A..T	G.A...A
#V158 (1)	...C...A..	.....T..T	.....T..	.....A	T...T..GA	T..T...T.	GT..GC.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V159 (1)	??..C...A..	.....T..T	.....T..	.....A	T...T..A	T..T...T.	GT..GC.GT.	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V160 (1)	??..C..TA..	.....G..T	..C.....	.....A	T...T..A	T..TC..T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	G.A...A
#V161 (1)	??...TA..	.....T	.....T	.....A	T...T..A	T..TC..T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	.CA..A
#V162 (1)	??..C..TA..	.....T	.....T	.....A	T...T..A	T..TC..T	GT..GC.G..	.....T....	.T..T.A..T	.CA...A

**Рис. 2.** Гаплотипы гена цитохрома *b* мтДНК углозуба Шренка. Положиции вариабельных нуклеотидов приведены в сравнении с нуклеотидной последовательностью гаплотипа V11 (Acc. N. EU567390). Положиция нуклеотида 1 соответствует нуклеотидной позиции 14228 полного митохондриального генома *Salamandrella keyserlingii* (Acc. No. NC008082; [9]). В скобках приводится число особей с определенным гаплотипом. В прописительными знаками отмечены неидентифицированные нуклеотиды.

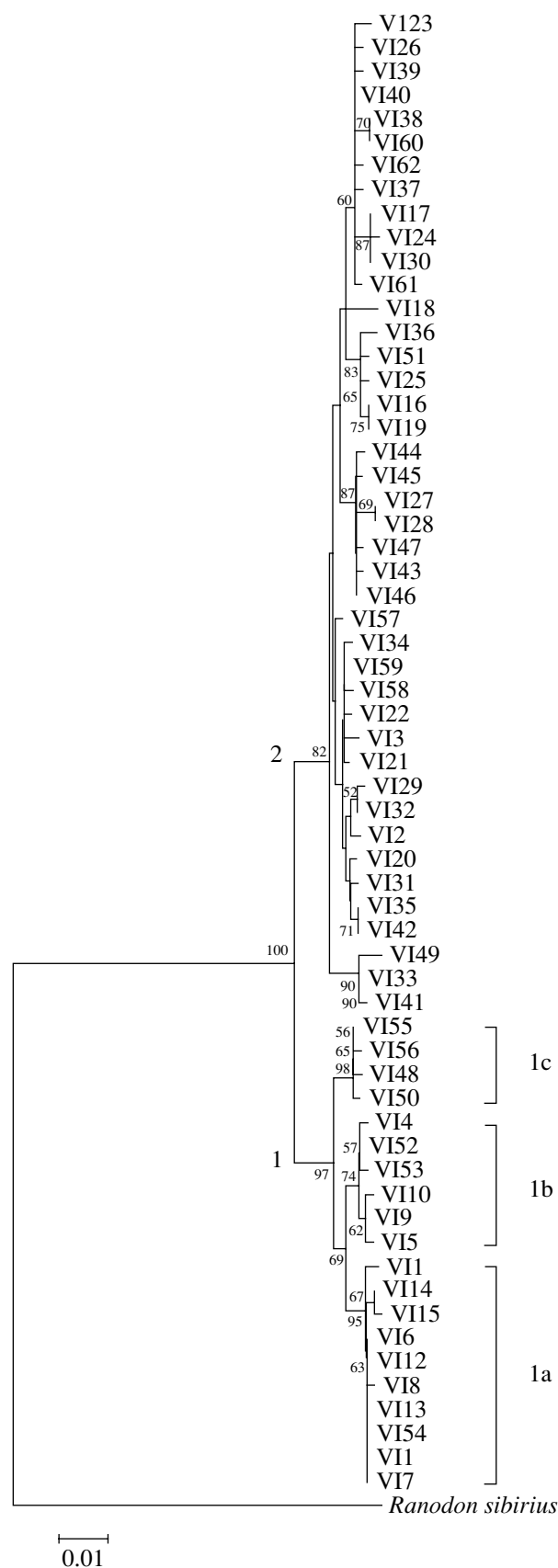
(данные не приводятся). Каждый из кластеров характеризуется собственной субструктурой. Так, кластер 1 состоит из трех субкластеров (1a, 1b и 1c), каждый из которых поддерживается значени-

ями бутстреп-индексов, превышающими 70%. Субструктура кластера 2 менее выражена; в нем наблюдается лишь несколько субкластеров с бутстреп-поддержкой более 70% (рис. 3).

Структурированность митохондриального генофонда углозуба Шренка проявляется и в филогеографии этого вида. Анализ распределения гаплотипов мтДНК показывает существование географической подразделенности в распределении кластеров 1 и 2 (рис. 3). Кластер 2 (“северный”) занимает северную часть Сихотэ-Алиня и прилегающие территории, включая долину Уссури и Амура (точки сбора 1–22, а также 26, 27, 32, 33 на рис. 1), а животные кластера 1 (“южного”) распространены в южной половине Сихотэ-Алиня и на прилегающих территориях, занимая южную и центральную часть ареала углозуба Шренка (точки сбора 23–35). Субкластеры в пределах двух крупных кластеров 1 и 2 объединяют гаплотипы мтДНК, располагающиеся, как правило, достаточно локально, что предполагает высокий уровень межпопуляционных различий.

Для исследования этого вопроса мы сгруппировали обследованные пункты в четыре условных района (региональные группы): (1) юг Приморья; (2) бассейн верхней и средней части Уссури; (3) бассейн нижней части Уссури; (4) бассейн рек правобережья Амура. Результаты анализа молекулярной изменчивости AMOVA [7] показали, что наблюдается очень высокий уровень межгрупповой дифференциации (табл. 1). На межгрупповые различия у углозуба Шренка приходится 50% изменчивости ( $F_{ST} = 0.501$ ,  $P = 0$ ). Распределение попарных межпопуляционных  $F_{ST}$ -различий свидетельствует о четкой дифференциации популяций юга и севера ареала углозуба, так как  $F_{ST}$ -различия между парами популяций (1)–(2) и (3)–(4) значительно меньше, чем между парами (2)–(3) (табл. 1). Аналогично, оценки показателя  $M$ , характеризующего вклад миграции в формирование популяционной структуры [11], свидетельствуют о более выраженном генетическом обмене между соседними популяциями только на юге и севере ареала, но не в его центре.

Несмотря на примерно равные объемы исследованных выборок углозуба Шренка, относящихся к кластерам 1 и 2 ( $n = 80$  и  $87$  соответственно), они существенно различаются по многим генетическим показателям (табл. 2). Степень дивергенции ( $d$ ) нуклеотидных последовательностей гена цитохрома  $b$  внутри кластеров 1 и 2 составляет 0.8 и 1% соответственно, а между кластерами – 3%, что со-



**Рис. 3.** NJ-дендрограмма р-расстояний между гаплотипами гена цитохрома  $b$  у углозубов Шренка. Обозначения гаплотипов мтДНК как на рис. 2. На ветвях приводятся бутстреп-индексы со значениями 60% и более. Нуклеотидная последовательность гена цитохрома  $b$  лягушкозуба семиреченского *Ranodon sibiricus* использована в качестве внешней группы. На дереве цифрами 1 и 2 показаны два основных филогенетических кластера мтДНК, а латинскими буквами – субкластеры в пределах каждого из кластеров.

**Таблица 1.** Генетические различия между популяциями углозуба Шренка

Популяции	1	2	3	4
1. Юг Приморья	0	1.61	0.43	0.30
2. Верхняя Уссури	0.237	0	0.58	0.30
3. Нижняя Уссури	0.539	0.464	0	3.40
4. Амур	0.623	0.621	0.128	0

Примечание. Под диагональю даны значения межпопуляционных  $F_{ST}$ -дистанций (все различия достоверны,  $P < 0.01$ ), над диагональю – значения показателя  $M$ , оценивающего обмен мигрантами [11] ( $M = Nm$ , где  $N$  – эффективный размер популяции,  $m$  – скорость миграции).

гласуется с полученными нами ранее оценками дивергенции мтДНК у углозуба Шренка [1]. Более выражены различия между кластерами 1 и 2 по степени разнообразия  $h$ , основанного на распределении частот гаплотипов мтДНК в популяциях. В пределах кластера 2 обнаружено примерно в два раза больше гаплотипов ( $k$ ) и полиморфных позиций ( $s$ ), чем в кластере 1. Аналогично ведут себя и популяционные показатели  $\theta_S$  и  $\theta_K$ , оценка которых основана соответственно на количестве полиморфных позиций и гаплотипов в популяциях. Величина показателя  $\theta_K$  отражает эффективный размер популяции, и поэтому полученные нами

данные позволяют заключить, что кластеры 1 и 2 существенно различаются по эффективному размеру, который почти в 4 раза выше у углозубов кластера 2 (см. табл. 2). Гаплотипы этого кластера характеризуются унимодальным распределением попарных нуклеотидных замен (рис. 4), что свидетельствует, по-видимому, о возможности недавней демографической экспансии или серии экспансий с высокой скоростью миграции между соседними группами животных [12–14]. Между тем, мультимодальный характер распределения попарных нуклеотидных различий, выявленный у углозубов Шренка кластера 1, свидетельствует о демографическом равновесии, т.е. об отсутствии экспоненциального роста численности популяции.

Тестирование двух моделей демографической экспансии показало, что только у углозубов кластера 2 характер разнообразия мтДНК соответствует ожиданию моделей с высокой степенью достоверности. Модель пространственной экспансии предполагает, что вначале численность росла в очень ограниченной области, но затем эта зона быстро расширилась за счет высокой скорости миграции особей [14]. Об экспоненциальном характере роста численности популяции углозуба Шренка кластера 2 свидетельствуют и результаты  $F_S$ -теста Фу на селективную нейтральность [15], которые показали очень высокое – достоверно отрицательное – значение  $F_S$ -статистики только для

**Таблица 2.** Показатели разнообразия мтДНК углозуба Шренка в кластерах 1 и 2

Генетические показатели	Кластер 1	Кластер 2
Размер выборки, $n$	80	87
Количество гаплотипов, $k$	20	42
Количество полиморфных позиций, $s$	31	53
Разнообразие, $h$	$0.88 \pm 0.02$	$0.96 \pm 0.01$
Среднее число попарных нуклеотидных различий, $i$	$6.04 \pm 2.91$	$5.82 \pm 2.81$
Дистанция $\rho$	$5.68 \pm 1.55$	$4.31 \pm 0.86$
Степень дивергенции, $d$	$0.008 \pm 0.002$	$0.010 \pm 0.002$
Популяционный показатель, $\theta_S$	6.2	10.3
Популяционный показатель, $\theta_K$	8.2	31.3
Демографические показатели (модель быстрой экспансии) $\tau$ , $\theta_0 - \theta_1$	10.92, 0–11.0 ( $P = 0.45$ )	6.86, 0–60.6 ( $P = 0$ )
Демографические показатели (модель пространственной экспансии) $\tau$ , $\theta_0$ , $M$	7.87, 3.29, 1.96 ( $P = 0.9$ )	6.72, 0.016, 25.4 ( $P = 0$ )
D (тест Таджимы)	$-0.11$ ( $P = 0.5$ )	$-1.41$ ( $P = 0.07$ )
$F_S$ (тест Фу)	$-1.55$ ( $P = 0.33$ )	$-24.69$ ( $P = 0$ )
Характер распределения попарных нуклеотидных различий	мультимодальный	унимодальный

Примечание.  $h$  – Разнообразие гаплотипов мтДНК [4];  $\tau$  – время экспансии, соответствующее числу попарных различий на этапе максимального роста численности популяции;  $\theta_0$  и  $\theta_1$  – мутационные параметры на начальном и конечном этапах роста численности популяции соответственно;  $M$  – показатель, оценивающий межпопуляционный обмен мигрантами. В скобках приводятся значения статистической значимости различий ( $P$ ). Объяснения остальных показателей приводятся в тексте статьи.

кластера 2 ( $F_S = -24.7$ ,  $P = 0$ ). Значения D-статистики (тест Таджимы [16]) для углозубов этого кластера тоже высоки, но не достигают уровня статистической значимости 5%. Следует отметить, что при анализе гаплотипов, сгруппированных в популяции (1), (2), (3) и (4), статистическая значимость  $F_S$ -статистик также увеличивается с юга на север – от незначительных значений ( $P = 0.9$  и  $0.3$ ) в региональных группах (1) и (2) до высоко достоверных значений ( $P = 0.016$  и  $0.002$ ) в группах (3) и (4). Тем самым, подтверждается вывод о том, что демографическую экспансию претерпели только популяции северной части ареала углозуба Шренка, преимущественно гаплотипами кластера 2.

Известно, что отклонения от нейтральности могут быть связаны не только с демографическими причинами, но и с гетерогенностью мутационных скоростей в исследуемом участке ДНК [8]. Однако результаты проведенного нами анализа гипотезы молекулярных часов с помощью теста Таджимы [8] показали, что гетерогенности мутационных скоростей при сопоставлении как гаплотипов двух кластеров углозуба Шренка относительно внешней группы (*Ranodon sibiricus*), так и двух видов углозуба (*S. schrenckii* и *S. keyserlingii*) относительно *R. sibiricus* ( $P > 0.2$  во всех случаях) не наблюдается. Таким образом, данные об изменчивости мтДНК можно использовать для датирования популяционных событий с помощью молекулярных часов.

Правомерен вопрос о происхождении двух форм (кластеров) углозуба Шренка, однако результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей не позволяют сделать уверенный вывод относительно того, какая из форм углозуба является более древней. Оба кластера сходятся к одному общему предку, а степень дивергенции внутри кластеров примерно одинакова. Тем не менее, различия между кластерами мтДНК углозуба выявляются при анализе распределения попарных нуклеотидных различий: среднее число попарных различий у углозубов кластера 1 ( $i = 6.0$ ) несколько выше, чем у представителей кластера 2 ( $i = 5.8$ ) (см. табл. 2). Еще более выраженные различия видны при анализе медианных сетей гаплотипов мтДНК (данные не представлены). Расчеты дистанции  $\rho$ , с помощью которых можно оценить среднее расстояние от гаплотипа-основателя ко всем производным гаплотипам в числе мутаций, показали, что кластер 1 более разнообразен ( $\rho = 5.7$ ), чем кластер 2 ( $\rho = 4.3$ ). При использовании значения скорости накопления мутаций в гене цитохрома *b*, равного 0.77% дивергенции (для транзиций и трансверсий) за 1 млн. лет [2], эволюционный возраст кластеров 1 и 2 составляет соответственно  $895000 \pm 244000$  и  $680000 \pm 135000$  лет.

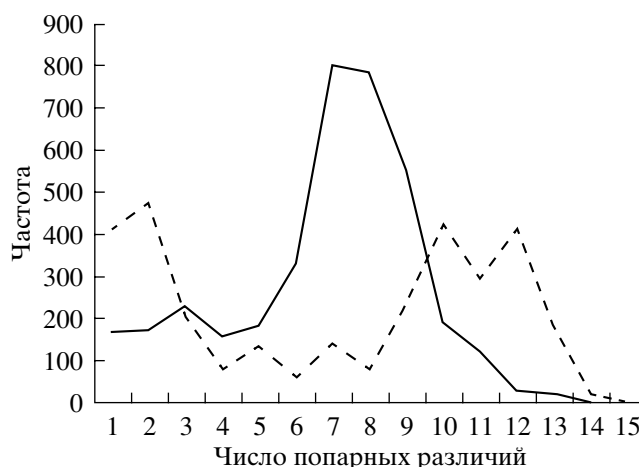


Рис. 4. Распределение попарных нуклеотидных различий между последовательностями гена цитохрома *b* углозуба Шренка в кластерах 1 (---) и 2 (—).

К интересным результатам приводит анализ распределения аминокислотных замен в анализируемом участке цитохрома *b* углозубов Шренка. Как было отмечено выше, лишь три замены аминокислот филогенетически информативны. Одна из них (Pе43Met) наблюдается в двух родственных гаплотипах (V127 и V128) (рис. 3). Обнаружена замена Pе46Val в кластерах 1 и 2 – в гаплотипе V150, относящемся к субкластеру 1c, а также в гаплотипах V1 16, 19, 25, 36, 51, которые объединяются в отдельный субкластер (бутстреп-индекс 83%) в составе кластера 2. Анализ аминокислотных последовательностей цитохрома *b* у других представителей семейства Hynobiidae (данные Genbank и работ [1, 9, 17]) показал, что полиморфизм Pе46Val наблюдается и у других видов – у *S. keyserlingii*, *Liua* sp., *Pseudohynobius* sp.; это свидетельствует о том, что такая замена появлялась независимо несколько раз в процессе эволюции Hynobiidae.

Третья аминокислотная замена, Pе119Val, также наблюдается у нескольких представителей родов *Hynobius* и *Salamandrella* (табл. 3). Однако межвидовое сопоставление участка цитохрома *b*, включающего в свой состав данную позицию, показало, что большинство представителей семейств Hynobiidae и Salamandridae характеризуются наличием изолейцина в позиции 119 (табл. 3). Этот факт определенно указывает на то, что вариант Pе119 имеет предковый статус. Такой же вариант характерен для части углозубов Шренка “южного” кластера 1, а именно для его субкластеров 1b и 1c (точки сбора 23-33 на рис. 1), в то время как углозубы субкластера 1a (точки сбора 30, 32-35) и все “северные” углозубы Шренка маркированы заменой Pе119Val. По-всей видимости, замена Pе119Val возникла независимо в двух кластерах углозуба Шренка, но наличие предкового статуса – изолейцина в позиции 119 у углозубов “южных” субкла-

**Таблица 3.** Аминокислотные различия в цитохроме *b* у представителей семейств *Hynobiidae* и *Salamandridae*

Таксоны	Аминокислотная позиция		
	118	119	120
<i>Euproctus</i> (3 вида)	Val	Ile	Leu
<i>Batrachuperus</i> (6 видов)	Ile	Ile	Leu
<i>Pseudohynobius</i> (2 вида)	Ile	Ile	Leu
<i>Hynobius</i> (7 видов)	Val	Ile	Leu
<i>Hynobius</i> (6 видов)	Val	<b>Val</b>	Leu
<i>Pachyhynobius shangchengensis</i>	Val	Ile	Leu
<i>Onychodactylus fischeri</i>	Val	Ile	Leu
<i>Liua shihi</i>	Ile	Ile	Leu
<i>Ranodon sibiricus</i>	Ile	Ile	Leu
<i>Salamandrella keyserlingii</i>	Val	Ile	Leu
<i>Salamandrella keyserlingii</i>	Val	<b>Val</b>	Leu
<i>Salamandrella schrenckii</i> (субкластеры 1b, 1c)	Val	Ile	Leu
<i>Salamandrella schrenckii</i> (субкластер 1a и кластер 2)	Val	<b>Val</b>	Leu

Примечание. Валин в позиции 119 выделен полужирным. Использованы данные Genbank и некоторых работ [1, 2, 9, 17].

стеров 1b и 1c может свидетельствовать в пользу их большей древности в сравнении с “северными” углозубами Шренка.

Проведенное исследование позволило нам сформулировать первые представления об особенностях молекулярной эволюции углозуба Шренка и его внутривидовой структуре. Основываясь на данных об изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b*, нам предоставилась возможность определить ареал этого вида, поскольку никакими другими методами, кроме молекулярно-генетических, сделать это пока невозможно. Оказалось, что ареал углозуба Шренка охватывает значительную часть юго-востока России, а наличие высокого уровня изменчивости мтДНК на внутривидовом и межпопуляционном уровнях свидетельствует о большом времени формирования генетического разнообразия углозуба Шренка и о влиянии различных факторов на его структуру. Результаты анализа изменчивости мтДНК и аминокислотных последовательностей цитохрома *b* свидетельствуют о том, что освоение современного ареала углозуба Шренка происходило, по всей видимости, с юга на север Приморья, поскольку на юге обитают углозубы, характеризующиеся предковым аминокислотным статусом

(Ile119) и более высокими значениями попарных нуклеотидных различий. Между тем, анализ генетико-демографических показателей свидетельствует о том, что популяции северной части ареала (кластер 2) претерпели в своей истории значительный рост численности, и их экспансия (в том числе на юг), возможно, продолжается до сих пор. Высокий уровень межпопуляционной дифференциации может свидетельствовать в пользу представлений о низкой миграционной активности углозуба Шренка и/или о периодах длительной изоляции, имевшей место в его эволюционной истории.

Авторы выражают искреннюю признательность М.А. Перковой за секвенирование некоторых образцов ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (04-04-48187а, 07-04-00362а, 07-04-10006к), Дальневосточного отделения РАН (04-3-А-06-009, 05-III-E-06-004, 06-III-Д-06-239, 07-III-Д-06-058) и Медицинской академии им. Л. Рьдыгера (BW 59/05).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берман Д.И., Деренко М.В., Малярчук Б.А., Гржибовский Т., Крюков А.П., Мишчицка-Шлипка Д. 2005. Генетический полиморфизм сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*, Caudata, Amphibia) в ареале и криптический вид углозуба *S. schrenckii* из Приморья. *Докл. РАН.* **403**, 427–429.
2. Caccone A., Milinkovitch M.C., Sbordoni V., Powell J.R. 1997. Mitochondrial DNA rates and biogeography in European newts (genus *Euproctus*). *Syst. Biol.* **46**, 126–144.
3. Saitou N., Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
4. Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. N.Y.: Columbia University Press. 763 p.
5. Kumar S., Tamura K., Nei M. 1993. MEGA, *Molecular evolutionary genetic analysis* ver. 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
6. Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 37–48.
7. Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online.* **1**, 47–50.
8. Tajima F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. In: *Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology*. Eds Takahata N., Clark A.G. Tokyo, Sunderland, MA: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., 37–59.
9. Zhang P., Chen Y.Q., Zhou H., Liu Y.F., Wang X.L., Papenfuss T.J., Wake D.B., Qu L.H. 2006. Phylogeny, evolution, and biogeography of Asiatic Salamanders (Hynobiidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 7360–7365.



10. Avise J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall: An Intern. Thomson Publ. Company. 482 p.
11. Slatkin M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res. Camb.* **58**, 167–175.
12. Rogers A.R., Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 552–569.
13. Aris-Brosou S., Excoffier L. 1996. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 494–504.
14. Ray N., Currat M., Excoffier L. 2003. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 76–86.
15. Fu Y.-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. **147**, 915–925.
16. Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. **123**, 585–595.
17. Lai J.-S., Lue K.-Y. 2008. Two new *Hynobius* (Caudata: Hynobiidae) salamanders from Taiwan. *J. Herpetol.* **64**, 63–80.