

На правах рукописи



Побединцева Мария Алексеевна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РЕЧНЫХ
И ОЗЕРНЫХ ПОЛИПЛОИДНЫХ РЫБ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск 2022

Работа выполнена в лаборатории сравнительной геномики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Научный Трифонов Владимир Александрович, доктор биологических
руководитель: наук, заведующий лабораторией сравнительной геномики
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Института молекулярной и клеточной биологии СО
РАН, г. Новосибирск

Оппоненты: Литвинов Юрий Нарциссович, доктор биологических наук,
заместитель директора по научной работе Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института систематики и экологии животных СО РАН, г.
Новосибирск

Щербаков Дмитрий Николаевич, кандидат биологических
наук, ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии
Федерального бюджетного учреждения науки
Государственного научного центра вирусологии и
биотехнологии «Вектор», р. пос. Кольцово

Ведущее Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение: учреждение Институт биологии развития им. Н.К.
Кольцова РАН, г. Москва

Защита состоится: 15 июня 2022 г. в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание
ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук
при ФГБУН Институте молекулярной и клеточной биологии СО РАН
(630090, г. Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-
49, e-mail: ovant@mcb.nsc.ru. С диссертацией можно ознакомиться в
библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО
РАН https://www.mcb.nsc.ru/diss_council/autoref
Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



О.В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Численность многих ценных промысловых видов рыб снижается в результате хозяйственной деятельности человека, браконьерства, ухудшения экологических условий. Существуют различные программы проведения рыбоохранных мероприятий, направленных на восстановление популяций. Но на данный момент очень сложно оценить, какой эффект они оказывают на естественные популяции и какую экономическую пользу приносят. Вклад таких мероприятий необходимо оценивать в развитии, он может проявляться спустя десятилетия (Ludwig 2006).

Исследование молекулярно-генетических характеристик популяций позволяет ответить на многие вопросы, связанные с эволюцией и демографической историей видов. Изучение этих процессов является неотъемлемой частью разработки природоохранных мероприятий по сохранению уязвимых видов.

Популяционный анализ полиплоидных видов сопряжен с определенными сложностями работы с данными вследствие выявления большего количества аллельных вариантов у каждого организма. Необходимо применение дополнительных параметров при интерпретации результатов анализа ядерных маркеров (Meirmans et al. 2018). Поэтому более удобным методом работы с полиплоидными видами является изучение митохондриальных (мт) линий.

Представители семейства осетровых (*Acipenseridae*) являются ценными промысловыми рыбами. Кроме того, они вызывают интерес исследователей с точки зрения генетических, физиологических и эволюционных особенностей. Считают, что происхождение этой древней группы можно отнести к Триасовому периоду. К современному семейству осетровых относится 25 видов, они все занесены в различные категории Международной красной книги, многие виды находятся на грани исчезновения (Raymakers 2006), из них на территории России обитает 11 видов. Для всех видов осетровых характерно позднее половое созревание, не ежегодный нерест и чувствительность к разнообразным внешним факторам (Решетников 2002). Осетровые занимают базальное положение среди лучеперых рыб и представляют собой идеальную эволюционную группу для исследования сложной взаимосвязи между фенотипами и полиплоидными геномами (Cheng et al. 2019).

В последние годы активно развивается аквакультура таких видов осетровых как стерлядь (*Acipenser ruthenus*) и сибирский осетр (*A. baerii*), что усиливает необходимость контролировать состояние природных популяций этих видов рыб.

Другой важный промысловый объект – серебряный карась (*Carassius gibelio*) из рода карасей семейства карповых Cyprinidae, обеспечивает значительный объем в общей добыче рыбы в Сибири. Эффект антропогенной интродукции амурской формы серебряного карася в различные водоемы северной Евразии и ее влияние на природные популяции в настоящее время обсуждается в литературе.

Целью данной работы является оценка молекулярно-генетического разнообразия речных и озерных полиплоидных рыб на примере стерляди, сибирского осетра и серебряного карася в водоемах северной Евразии с помощью митохондриальных маркеров, а также выяснение филогенетических взаимоотношений между основными гаплогруппами внутри видов и сравнение состояния современных популяций этих видов. Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести филогенетический и популяционный анализ стерляди (*A. ruthenus*) и сибирского осетра (*A. baerii*) на большей части их ареала, а также серебряного карася (*C. gibelio*) в бассейне Средней Оби;
2. Сравнить популяции стерляди и сибирского осетра в реках Сибири по популяционным параметрам;
3. Исследовать степень изоляции популяций этих видов в разных географических районах;
4. Изучить гаплотипическое разнообразие ископаемых образцов стерляди (*A. ruthenus*) и их филогенетические взаимоотношения с современными популяциями бассейна Волги;
5. Изучить демографическую историю популяций стерляди и сибирского осетра.
6. Определить время расхождения клад и гаплогрупп осетровых и подтвердить топологию их филогенетического древа.

Научная новизна. В настоящем исследовании впервые описана значительная выборка осетровых из рек Сибири, охарактеризовано 103 ранее не опубликованных гаплотипа стерляди, 43 – сибирского осетра, 3 – серебряного карася. Впервые проведено сравнение генетического разнообразия стерляди и сибирского осетра на больших выборках в реках Сибири.

Исследованы филогенетические взаимоотношения между основными гаплогруппами стерляди и сибирского осетра и впервые посчитано время расхождения клад основных гаплогрупп и время дивергенции внутри гаплогрупп. В ходе работы впервые была подтверждена топология филогенетических взаимоотношений этих двух видов осетровых с применением данных полных митохондриальных геномов.

Впервые получены данные по молекулярно-генетическим характеристикам популяций стерляди в бассейне Волги IV-XVIII веков, и проведен сравнительный анализ с современными популяциями.

Описано влияние антропогенной интродукции на генетическое разнообразие популяций серебряного карася в Средней Оби.

Положения, выносимые на защиту. Генетическое разнообразие стерляди (*A. ruthenus*) в сибирских реках почти в 10 раз выше, чем сибирского осетра (*A. baerii*), что говорит о более уязвимом статусе вида *A. baerii*. В популяции серебряного карася (*C. gibelio*) в Средней Оби наблюдается невысокое генетическое разнообразие, что обусловлено эффектом основателя.

При исследовании структур популяций стерляди (*A. ruthenus*) и сибирского осетра (*A. baerii*) в разных речных бассейнах установлено, что внутри одного бассейна вид представлен единой популяцией, а популяции разных бассейнов в большинстве случаев изолированы. В популяции серебряного карася (*C. gibelio*) в бассейне Средней Оби наблюдается процесс замещения автохтонных форм интродуцированными.

Среди ископаемых образцов стерляди в бассейне Волги доминируют гаплогруппы С, Е и F, и отсутствуют гаплогруппы А, D, I, J, K и L, преобладающие в восточной части ареала.

В популяциях стерляди около 100 тысяч лет назад произошло событие «бутылочного горлышка». Для сибирского осетра не обнаружено резкого изменения численности в течение последних 2 млн лет.

Клады гаплогрупп стерляди разошлись около 9 млн лет назад, расхождение гаплогрупп внутри клад происходило в период от 4 до 7 млн лет назад. Расхождение основных гаплогрупп сибирского осетра произошло около 5 млн лет назад, а внутри гаплогрупп происходило от 0,5 до 2 млн лет назад.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы. Данные филогенетического и популяционного анализа послужат основой для формирования новых взглядов на уточнение систематики видов стерлядь (*A. ruthenus*), сибирский осетр (*A. baerii*) и серебряный карась (*C. gibelio*). Подтверждена гипотеза о медленной эволюции осетрообразных (Krieger & Paul A Fuerst 2002).

Описанное нами различие в гаплотипическом составе популяций позволяет предсказать, к какому речному бассейну относится образец. Полученные результаты внесены в общедоступные базы данных и могут быть в дальнейшем использованы при планировании

рыбоохранных мероприятий и выпуске аквакультурных особей с целью восстановления природных популяций.

Степень достоверности и апробация результатов. Научные положения и выводы являются обоснованными. Полученные результаты являются достоверными и опираются на применение широко признанных статистических методов популяционной генетики, а также обеспечены согласованностью с результатами, представленными в процитированной литературе. Материалы диссертационной работы были представлены на 5 международных конференциях: V научно-практическая конференция молодых ученых с международным участием «Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса», г. Москва, 17-18 апреля 2017 г.; II Всероссийская конференция с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике», г. Новосибирск, 18-23 июня 2017 г.; XXV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», г. Москва, 9-13 апреля 2018 г.; Международная конференция «Хромосома 2018», г. Новосибирск, 20-24 августа 2018 г.; 3-я Международная конференция «SmartBio», г. Каунас, Литва, 2-4 мая 2019 г.

Публикации. Материал диссертации представлен в 3 статьях в рецензируемых журналах, все из списка ВАК, две опубликованы, одна статья находится в печати, и имеется 13 публикаций в виде тезисов конференций.

Вклад автора. Автором полностью выполнена экспериментальная работа по гаплотипированию коллекций субфоссильных и современных образцов. Подготовлены библиотеки митохондриальной ДНК (мтДНК) под индексами Illumina для получения прочтений полных мт геномов. Гаплотипический анализ проводился совместно с Трифоновым В.А. Филогенетический и популяционный анализ современных образцов проводился совместно с Кичигиным И.Г., образцов субфоссильных проб – совместно с Кливером С.Ф. Обработка данных высокопроизводительного секвенирования проводилась совместно с Макуниным А.И.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 163 ссылки и 10 приложений. Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 22 рисунка.

Благодарности автора. Работа выполнена в Отделе разнообразия и эволюции животных Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Автор выражает благодарность своим коллегам – Трифонову

В.А., Сердюковой Н.А., Макунину А.И., Кичигину И.Г., Молодцевой А.С. и всем сотрудникам Отдела разнообразия и эволюции геномов ИМКБ СО РАН. А также Решетниковой С.Н., сотруднику Новосибирского отделения ВНИРО. Автор выражает особую благодарность Интересовой Елене Александровне и Хакимову Рашиту Миниахметовичу за предоставленный материал и всестороннюю поддержку проекта. Аськеевым Игорю Васильевичу и Олегу Васильевичу за предоставление субфоссильных образцов и обработку археологического материала. Разные этапы работы были поддержаны грантами РНФ 14-14-00275, 18-44-04007.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает семь разделов и заключение. Рассмотрены геномные особенности ярких представителей ценных промысловых полиплоидных видов рыб в водоемах северной Евразии – осетровых и карповых. Подробно описаны методы филогенетического и популяционного анализа и их применение для полиплоидных организмов. Представлена информация об изучении ископаемых форм изучаемых видов, а также о современном состоянии популяционных исследований осетровых и карповых.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы, использованные в работе. Дикие образцы стерляди, сибирского осетра и серебряного карася были собраны в ходе программ экологического мониторинга, выполняемых Государственным научно-производственным центром рыбного хозяйства. Образцы стерляди из реки Волга взяты из коллекции Ульяновского государственного педагогического университета. Образцы субфоссильных проб стерляди предоставлены лабораторией биомониторинга Института проблем экологии и недропользования Академии наук Республики Татарстан. Образцы осетровых рыб из аквакультуры были приобретены на рыбных фермах в г. Тюмени, г. Северске и Томской области (ООО НПО "Томэко").

Методы молекулярной биологии. Выделение ДНК проводили на колонках DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) в соответствии с протоколом производителя. В работе использованы стандартные методы молекулярной биологии: ПЦР, секвенирование по методу Сэнгера. Приготовление библиотек мтДНК под индексами Illumina проводили по протоколу производителя. Экстракцию древней ДНК проводили в специализированном боксе по методу Янга с соавторами (Yang et al. 1998) с модификацией по Сандерсону (Sanderson et al. 1995).

Биоинформатический анализ данных. Выравнивание последовательностей проводили в программном обеспечении Geneious v 10.0.9 (Kearse et al. 2012) с использованием стандартных алгоритмов. Филогенетический анализ проводили с применением программного обеспечения MrBayes v3.2.5 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), RAxML v8.0 (Silvestro & Michalak 2012; Stamatakis 2014), jmodeltest2 (Darriba et al. 2012), FigTree v1.4.2, Haplotype Viewer. Для популяционного анализа использовали программное обеспечение Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010), DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009) и BEAST 1.8.3 (Drummond et al. 2012).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Структура популяции стерляди (*A. ruthenus*) в реках северной Евразии

Филогения и филогеография современных образцов стерляди

Были получены нуклеотидные последовательности контрольного района мтДНК 331 образца стерляди (*A. ruthenus*) и одного образца близкого к стерляди вида - шипа (*A. nudiventris*). Филогенетический анализ последовательности 628 пн выявил 103 новых гаплотипа по 117 полиморфным сайтам. Филогенетический анализ показал, что они объединяются в 12 основных гаплогрупп (Рис. 1).

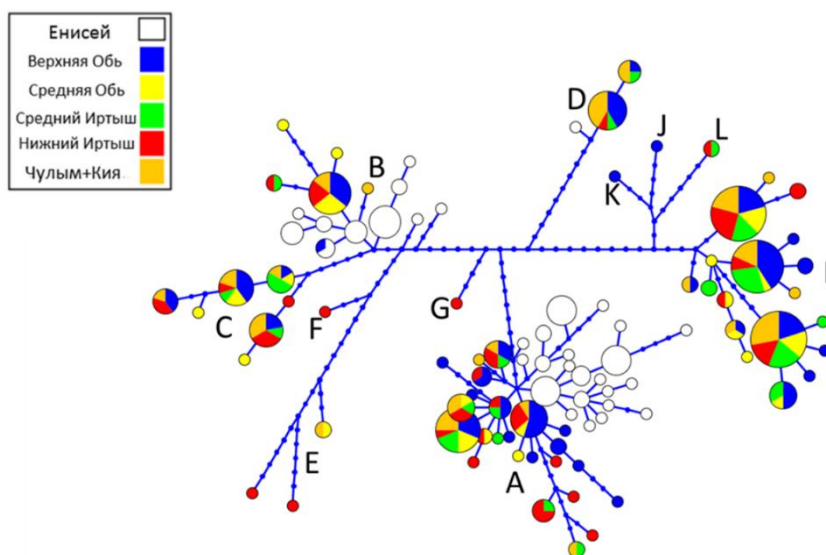


Рисунок 1. Взаимоотношения между гаплотипами стерляди в реках Сибири, полученные с использованием программы HaplotypeViewer. В качестве входной топологии использовалось филогенетическое древо, построенное по методу максимального правдоподобия.

Мы определили две отдельные клады, одна включает гаплогруппы А-Н, вторая – представлена гаплогруппами I-L. Гаплогруппы А-Г, I-L были обнаружены в Обь-Иртышском бассейне, гаплогруппы С, Е, F и Н – в бассейне Волги, гаплогруппы А, В и D – в бассейне Енисея. Все

гаплогруппы представлены в разных регионах бассейна Оби и Енисея с разной частотой. Отдельные гаплогруппы и гаплотипы специфичны для определенных речных бассейнов (Рис. 2). Различие в гаплотипическом составе популяций позволяет предсказать, к какому речному бассейну относится образец.

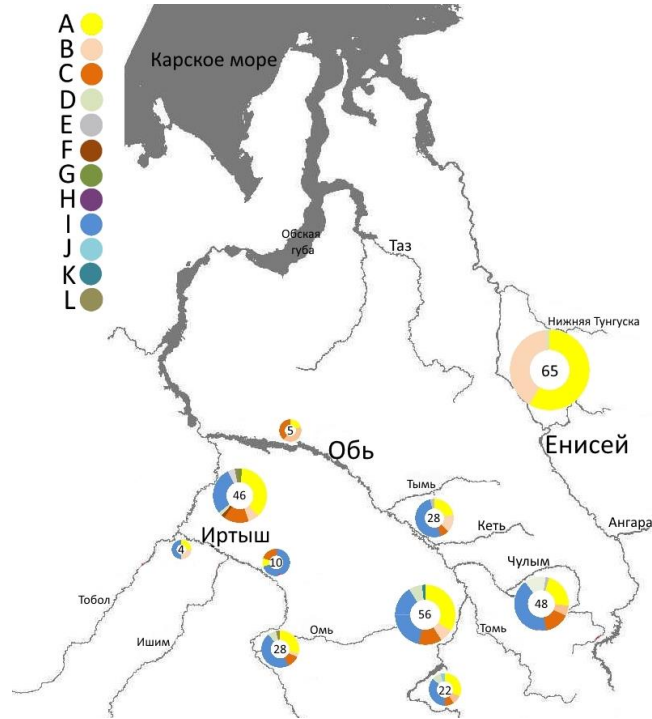


Рисунок 2. Распределение гаплогрупп стерляди в разных регионах Обь-Иртышского бассейна и бассейна Енисея. В круговых диаграммах указано количество особей, полученных из данного региона. Гаплогруппа Н была обнаружена только в бассейне Волги и отсутствует на данной схеме.

Нуклеотидное разнообразие (P_i) в популяции стерляди является схожим в разных регионах Обь-Иртышского бассейна ($P_{i\text{cp}} = 0.028$), но снижено в Енисее ($P_i = 0.018$). Мы включали в анализ только те популяции, в которых объем выборки был больше 10 особей.

Мы наблюдаем высокое гаплотипическое разнообразие (H_d) в отдельных популяциях Иртыша: в Среднем Иртыше А значение $H_d = 0.955$, в Среднем Иртыше Б – $H_d = 0.966$. В том числе, там были обнаружены некоторые редкие гаплогруппы и гаплотипы (такие как, F и G). Гаплотипическое разнообразие в популяции Оби схоже с популяцией Иртыша ($H_{d\text{cp}} = 0.956$). В Енисее значение гаплотипического разнообразия схоже со средним значением Обь-Иртышского бассейна ($H_d = 0.946$ и $H_d = 0.947$, соответственно). В Енисее были обнаружены только гаплогруппы А (в основном, подгруппа A1E), В и D (редко), что разительно отличается от Обь-Иртышского бассейна, где гаплогруппы I, А и С были найдены во всех

регионах бассейна в достаточном количестве (10 и более особей), а так же встречались редкие гаплотипы.

Такая разница в частотах гаплотипов предполагает, что популяции Оби и Енисея изолированы ($F_{st} = 0.18632$, $p\text{-value} < 10^{-5}$). Внутри Обь-Иртышского бассейна, наоборот, не наблюдается достоверной изоляции популяций, несмотря на неравномерное распределение гаплотипов в разных регионах бассейна (Табл. 1). Под диагональю (*) приведены значения индекса фиксации F_{st} , над диагональю – наличие (+) или отсутствие (-) достоверности изоляции популяции ($P\text{-value} < 0,05$).

Таблица 1. Значения попарного F_{st} в популяциях стерляди и достоверность $P\text{-value}$

	Верхняя Обь А	Верхняя Обь Б	Средняя Обь А	Средняя Обь Б	Средний Иртыш А	Средний Иртыш Б	Нижний Иртыш А	Нижний Иртыш Б	Чулым+Кия	Енисей
Верхняя Обь А	*	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Верхняя Обь Б	-0.02701	*	-	-	-	-	-	-	-	+
Средняя Обь А	-0.00808	-0.00123	*	+	-	-	-	-	-	+
Средняя Обь Б	0.14672	0.13876	0.14680	*	+	+	-	+	+	-
Средний Иртыш А	-0.01798	-0.01207	-0.01622	0.18509	*	-	-	-	-	+
Средний Иртыш Б	0.04648	0.05400	-0.00576	0.34937	0.01069	*	-	+	-	+
Нижний Иртыш А	-0.07355	-0.04722	-0.05962	0.13910	-0.03858	0.01084	*	-	-	+
Нижний Иртыш Б	-0.01521	-0.00223	0.01931	0.08907	0.01758	0.10101	-0.04127	*	-	+
Чулым+Кия	-0.01936	-0.00588	-0.00775	0.14309	-0.01180	0.02467	-0.03787	0.01427	*	+
Енисей	0.20614	0.19126	0.27804	0.19376	0.26751	0.45271	0.22899	0.13647	0.24097	*

Филогения и филогеография ископаемых образцов стерляди

В исследование вошли 18 образцов стерляди из субфоссильных проб возрастом от 300 до 1600 лет, полученных в ходе работы экспедиций на археологических памятниках на территории Среднего и Нижнего Поволжья. Методом секвенирования по Сэнгеру собран фрагмент контрольного района мтДНК, длиной 489/490 пн с непрочитанным разрывом разной длины (22-24 пн). Мы добавили в анализ 25 современных гаплотипов стерляди из разных речных бассейнов, чтобы сравнить древние и современные последовательности. Выборка включает все основные гаплогруппы, обнаруженные нами ранее. Филогенетический анализ 489 пн контрольного района мтДНК 18 древних образцов показал их близость к 3 современным гаплогруппам – С, Е и F. Взаимные филогенетические

отношения между ранее описанными гаплотипами, современными гаплотипами стерляди из Камы (бассейн Волги) и последовательностями, полученными для ископаемых образцов стерляди представлены на Рис. 3.

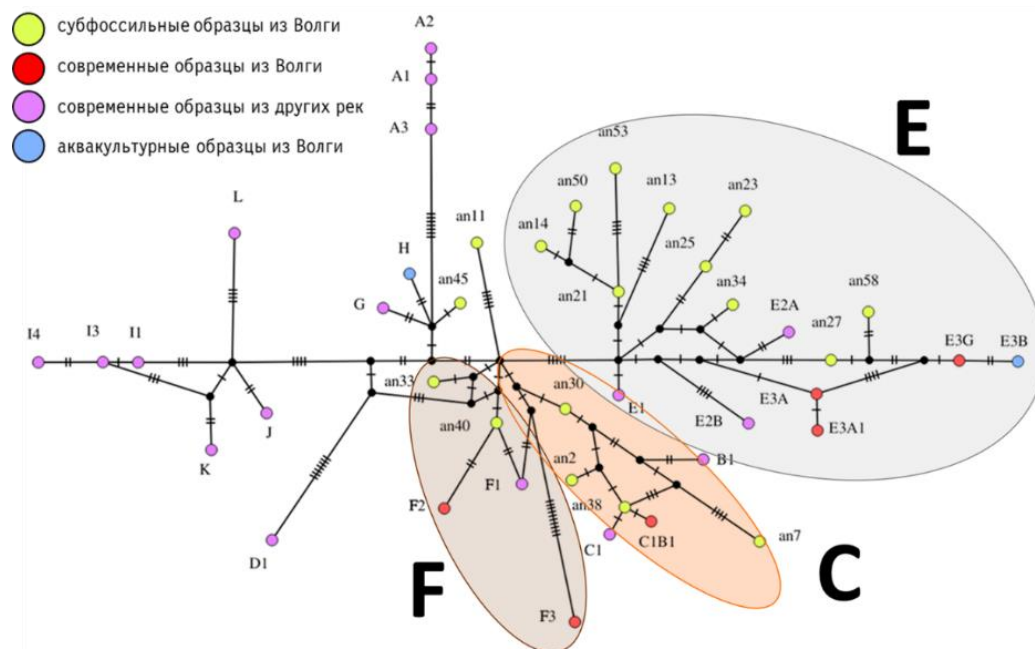


Рисунок 3. Взаимоотношения между гаплотипами ископаемых и современных образцов стерляди. Гаплотипическая сеть построена с использованием программы PopArt v1.7 (Leigh & Bryant 2015). Реконструкция взаимоотношений выполнена по алгоритму TCS (Clement et al. 2002).

На гаплогруппы B, C, E и F приходится 28% всей выборки стерляди, при этом все же большая часть из них принадлежит к гаплогруппам B и C, а к E и F относятся только единичные особи, но тем не менее, мы можем придать этим гаплогруппам статус «общих», не характерных для определенной популяции. К гаплогруппам A, D, I, J, K, L относятся 72% всех образцов из рек Сибири (Рис. 1, Рис. 3). Представителей этих гаплогрупп мы не обнаружили в бассейне Волги ни среди современных, ни среди ископаемых образцов, так же присутствие данных гаплотипов в реках западной части ареала стерляди не было описано в литературе. Таким образом, эти гаплогруппы мы можем назвать «восточными» - характерными только для представителей стерляди в Обь-Иртышском бассейне и Енисее. Причиной появления таких «общих» гаплогрупп для непроходных видов рыб является обмен генов, но на данный момент непонятно, вызван ли он естественными причинами или искусственными. Наличие в регионах страны рыбных хозяйств, где маточные стада имеют волжское происхождение и выпуск в реки молоди из таких хозяйств,

может приводить к распространению «западных» гаплотипов в реках Сибири.

Демографическая история популяции стерляди и оценка молекулярных часов

Мы получили оценку скорости закрепления мутаций для контрольного района мтДНК, она составила $2,3 \times 10^{-3}$ замен на сайт на миллион лет. Анализ молекулярной датировки показал, что расхождение двух основных клад гаплогрупп стерляди (гаплогруппы А-Н и гаплогруппы I-L) произошло около 9 миллионов лет назад, а расхождение гаплогрупп внутри клад происходило между 7 и 4 миллионами лет назад (Рис. 4), указывая на сравнительно древний возраст вида *A. ruthenus* (Peng et al. 2007).

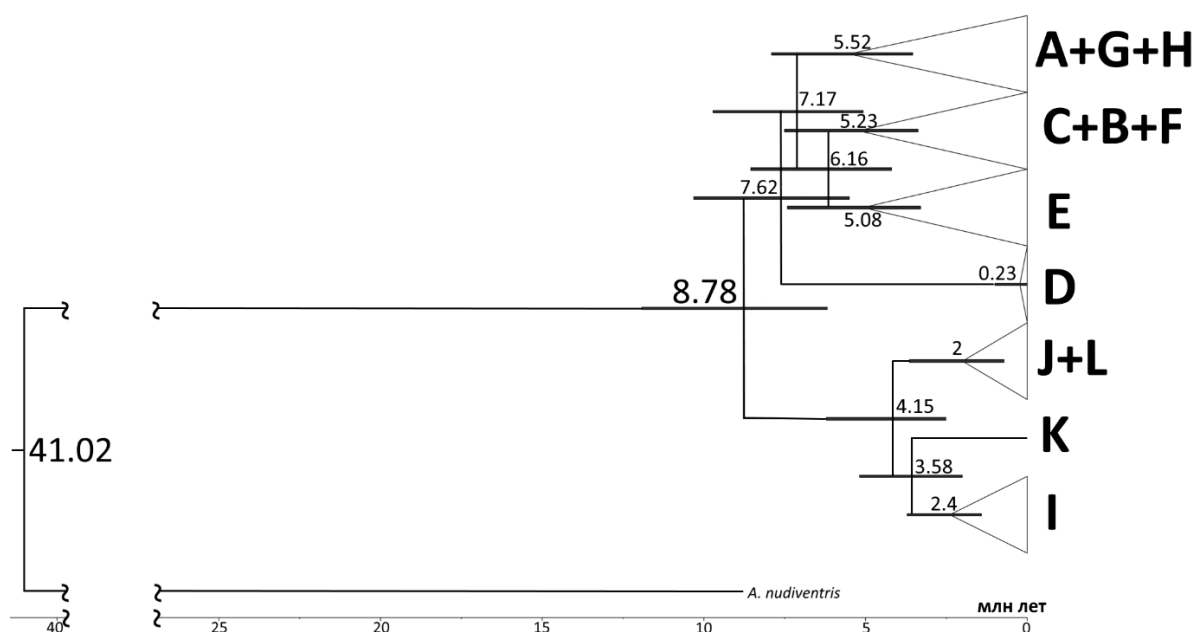


Рисунок 4. Анализ молекулярной датировки времени расхождения двух основных клад гаплогрупп стерляди.

Чтобы сделать выводы о динамике популяций стерляди Оби и Енисея, мы проанализировали распределение попарных различий и построили Bayesian skyline plot для популяций Обского и Енисейского бассейнов. Результат показал значительную экспансию популяции в Обь-Иртышском бассейне примерно 0,9–1,2 миллионов лет назад. В то время как, в бассейне Енисея экспансия популяции не наблюдалась в течение последних 2 млн лет (Рис. 5).

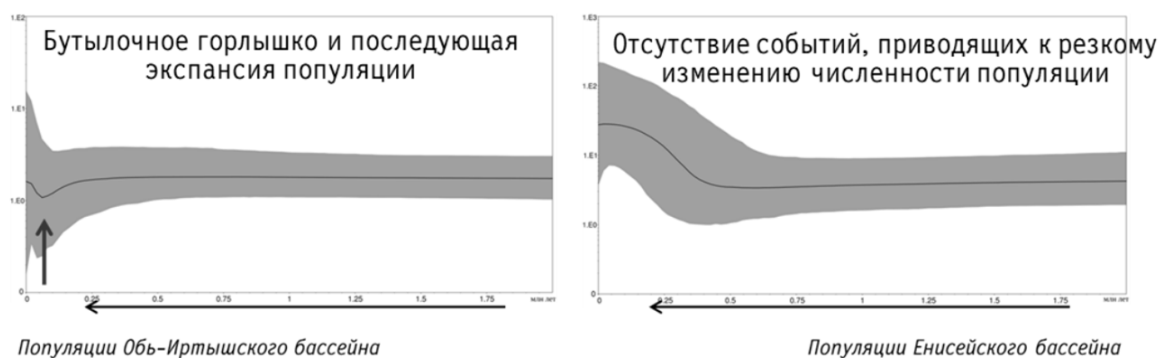


Рисунок 5. Bayesian skyline plot, отражающий динамику численности популяции стерляди в бассейне Оби (слева) и Енисея (справа). Графики читаются в направлении, указанном черной стрелкой, так как события рассматриваются от более ранних к более поздним. Графики построены в программе BEAST по последовательности контрольного района мтДНК. По оси ординат отложены $N_e t$ (эффективный размер популяции и время генерации в годах), по оси абсцисс – время в млн лет. Серая закрашенная область показывает доверительный интервал 95%. Вертикальная стрелка указывает на момент события «бутылочного горлышка».

2. Структура популяции сибирского осетра (*A. baerii*) в реках северной Евразии

Были получены нуклеотидные последовательности контрольного района мтДНК 298 образцов сибирского осетра (*A. baerii*). Филогенетический анализ последовательности 655 пн выявил 61 новый гаплотип по 68 полиморфным сайтам. Филогенетический анализ показал, что они объединяются в 2 основные гаплогруппы – А и В (Рис. 6).

Для сибирского осетра различия в составе гаплогрупп и встречаемости гаплотипов выражены не так четко, как для стерляди, но тем не менее можно однозначно отметить, что гаплогруппа А распространена повсеместно, во всех исследуемых бассейнах (Рис. 6, Рис. 7), но отдельные гаплотипы представлены по-разному в разных регионах.

Гаплогруппа В широко представлена в Обь-Иртышском бассейне, единичные особи встречаются в Енисее, и не обнаружены в Лене. По сравнению со стерлядью, в популяции сибирского осетра чаще встречаются гаплотипы, распространенные во всех трех бассейнах. Это может быть связано с тем, что сибирский осетр, в отличие от стерляди, является проходным видом и может совершать миграции, в том числе выходить в моря.

Нуклеотидное разнообразие (P_i) в популяции сибирского осетра сходно в разных районах Обь-Иртышского бассейна ($P_{i\text{cp}} = 0.0082$), значительно снижено в Енисее ($P_i = 0.0047$) и еще ниже в Лене ($P_i = 0.0039$). Для гаплотипического разнообразия (H_d) такой тенденции не

наблюдается – его значения близки друг к другу в разных бассейнах ($Hd_{Обь} = 0.848$, $Hd_{Енисей} = 0.818$, $Hd_{Лена} = 0.767$).

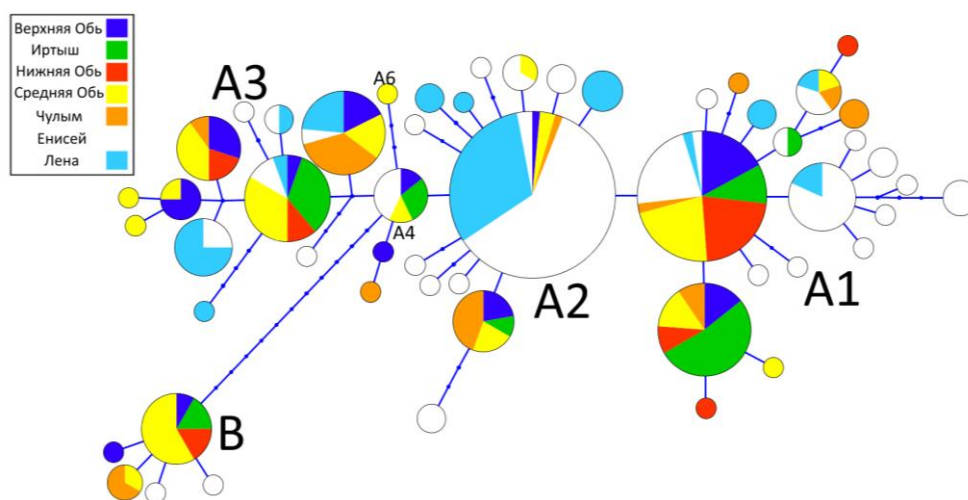


Рисунок 6. Взаимоотношения между гаплотипами сибирского осетра, полученные с использованием программы Harplotviewer. В качестве входной топологии использовали филогенетическое древо, построенное по методу максимального правдоподобия.

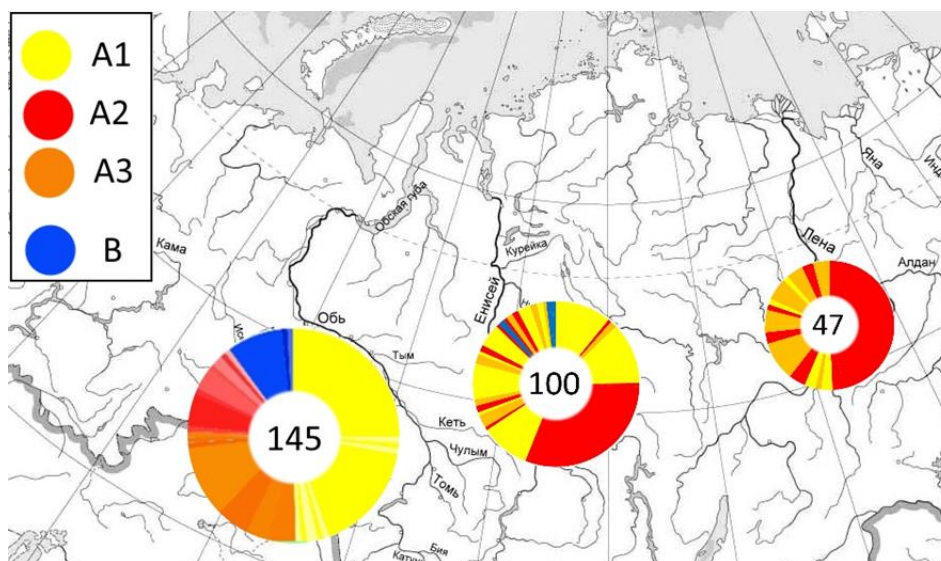


Рисунок 7. Распределение гаплогрупп сибирского осетра в речных бассейнах Оби, Енисея и Лены. В круговых диаграммах указано количество особей, полученных из данного региона. Разные оттенки цветов основных гаплогрупп (желтый – A1, красный – A2, оранжевый – A3, синий – B) отображают разные гаплотипы внутри данных гаплогрупп.

Разница в частотах гаплотипов предполагает наличие изоляции между Обь-Иртышским и восточными бассейнами. Анализ молекулярной дисперсии показал достоверные значения изоляции всех трех речных бассейнов (F_{st} (Обь-Енисей) = 0.06987, p -value $< 10^{-5}$, F_{st} (Обь-Лена) = 0.07258, p -value $< 10^{-5}$, F_{st} (Енисей-Лена) = 0.05173, p -value $< 10^{-5}$). Между разными регионами Обь-Иртышского бассейна

достоверной изоляции популяции сибирского осетра не наблюдается (Табл. 2).

Таблица 2. Значения попарного Fst в популяциях сибирского осетра и достоверность P-value

	Нижняя Обь	Верхняя Обь	Средняя Обь	Иртыш	Чулым	Енисей	Лена
Нижняя Обь	*	-	-	-	-	+	+
Верхняя Обь	0.01132	*	-	-	-	+	+
Средняя Обь	0.01527	0.00225	*	-	-	+	+
Иртыш	0.01934	0.03148	0.03892	*	-	+	+
Чулым	0.01543	-0.01972	0.00195	0.04157	*	+	+
Енисей	0.07609	0.07180	0.12872	0.10844	0.07049	*	+
Лена	0.14072	0.05891	0.11491	0.15505	0.06104	0.05173	*

Под диагональю (*) приведены значения индекса фиксации Fst, над диагональю – достоверность изоляции популяции (P-value < 0,05).

Анализ молекулярной датировки показал, что гаплогруппы А и В сибирского осетра разошлись около 4 млн лет назад, а дивергенция внутри основных гаплогрупп происходила около 1-2 млн. лет назад (Рис. 8).

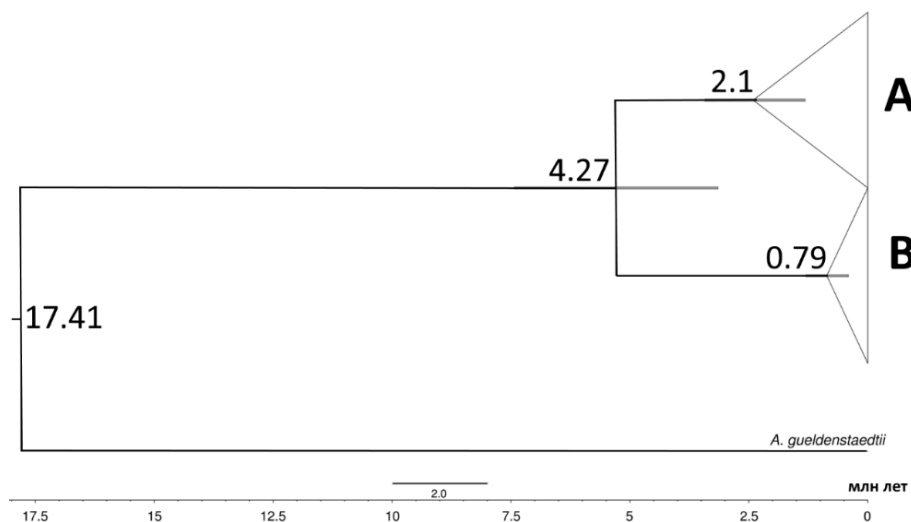


Рисунок 8. Анализ молекулярной датировки времени расхождения двух основных гаплогрупп сибирского осетра.

Оценка времени расхождения основных гаплогрупп стерляди и сибирского осетра подтверждает гипотезу о медленной эволюции осетрообразных (Krieger & Paul A. Fuerst 2002), поскольку скорость образования гаплогрупп исследуемых видов осетровых, сравнима со скоростью видообразования некоторых костистых рыб (Bolnick & Near 2005).

Для оценки динамики популяций сибирского осетра Оби, Енисея и Лены мы провели анализ распределения попарных различий и построили Bayesian skyline plot для популяций всех трех речных бассейнов. Результат показал, что в популяции Обь-Иртышского бассейна не происходит изменения численности. В случае восточных бассейнов Енисея и Лены мы наблюдаем изменения численности популяции, происходящие в течение последних 100 тыс. лет (Рис.9).

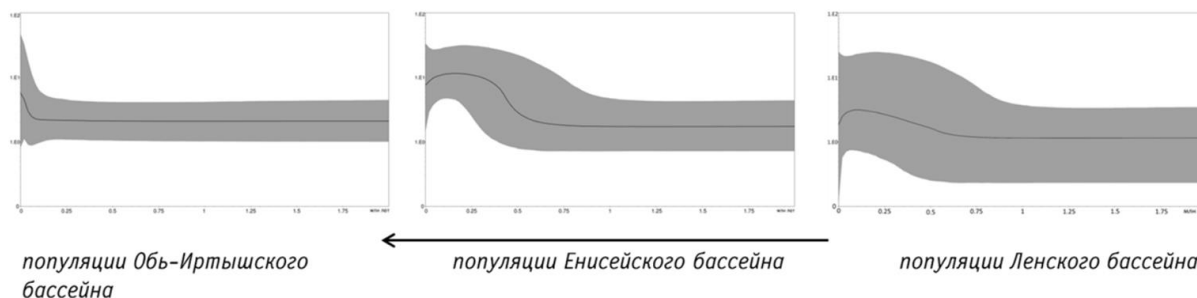


Рисунок 9. Bayesian skyline plot, отражающий динамику численности популяции сибирского осетра в бассейнах Оби (слева), Енисея (по центру) и Лены (справа). Графики читаются в направлении, указанном черной стрелкой, так как события рассматриваются от более ранних к более поздним. Графики построены в программе BEAST по последовательности контрольного района мтДНК. По оси ординат отложены $N_e t$ (эффективный размер популяции и время генерации в годах), по оси абсцисс – время в млн лет. Серая закрашенная область показывает доверительный интервал 95%.

3. Анализ полных митохондриальных геномов представителей основных гаплогрупп стерляди и сибирского осетра

Филогенетический анализ последовательностей полных митохондриальных геномов, полученных секвенированием на платформе Illumina, был проведен для представителей основных гаплогрупп исследованных видов осетровых – 12 гаплогрупп стерляди, 2 гаплогруппы сибирского осетра и единственного представителя вида шип. Древо, построенное по последовательностям полных митохондриальных геномов, подтверждает близкое положение видов стерлядь и шип, и внешнее к ним расположение сибирского осетра (Рис. 10). Сибирский осетр представлен только двумя гаплогруппами, их расхождение случилось достаточно давно и хорошо поддержано. Двенадцать основных гаплогрупп стерляди, обнаруженных в реках Сибири кластеризуются в 4 клады (B+C+F+K+E; I+J+L; A+G+H; D). Все ветви полученного филогенетического древа имеют достаточную бутстрэп-поддержку, кроме ветви общей для гаплогрупп стерляди B, C, F, K, E.

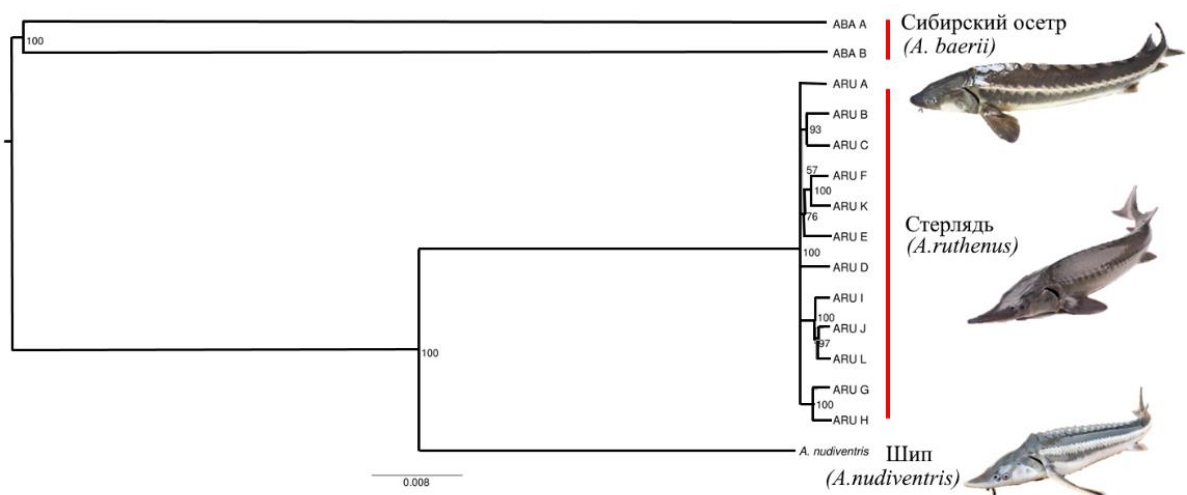


Рисунок 10. Филогенетическое древо основных гаплогрупп стерляди (*A. ruthenus*), сибирского осетра (*A. baerii*) и близкого к стерляди вида шип (*A. nudiventris*), построенное по последовательностям полных митохондриальных геномов. Древо построено байесовским методом. Цифры над ветвями отражают Байесовские постериорные вероятности.

4. Структура популяции серебряного карася (*C. gibelio*) в реках северной Евразии

Мы получили нуклеотидные последовательности контрольного района мтДНК 83 образцов серебряного карася (*C. gibelio*). Филогенетический анализ последовательности 460 пн выявил 9 гаплотипов, принадлежащих к 2 гаплогруппам. Результаты проведенного анализа свидетельствуют, что гаплотип A0 доминирует во всех водоёмах. Гаплотипы A1, A2, A3, A4 и A6 не сильно отличаются от доминирующего гаплотипа A0. Гаплотип A5 образовался из предкового гаплотипа A0 в результате делеции в 18 пн. Гаплогруппа B филогенетически значительно отличается от гаплогруппы A (Рис. 11).

Наиболее высоким нуклеотидным (P_i) и гаплотипическим (H_d) разнообразием обладают локальные популяции карася самой северной выборки из р. Обь (Александровский район) ($P_i = 0.015$, $H_d = 0.714$), а также из оз. Монатка ($P_i = 0.008$, $H_d = 0.711$), периодически имеющему связь с Обью и материковыми озерами, где, возможно, существуют рефугиумы автохтонных форм вида. Наименьшее разнообразие зарегистрировано в оз. Сартлан ($P_i = 0$, $H_d = 0$), где, возможно, за 20 лет произошло замещение аборигенных форм серебряного карася амурским вселенцем.

Наличие гаплогруппы B (Рис. 12), ранее описанной в Верхнем Иртыше и базальной для всех описанных гаплотипов (Sakai et al. 2009), может указывать на сохранение автохтонных форм серебряного карася в регионе. Присутствие в большинстве выборок гаплотипа A, характерного для амурской формы серебряного карася, может

свидетельствовать о процессах замещения автохтонных форм данного вида интродуцированными амурскими формами.

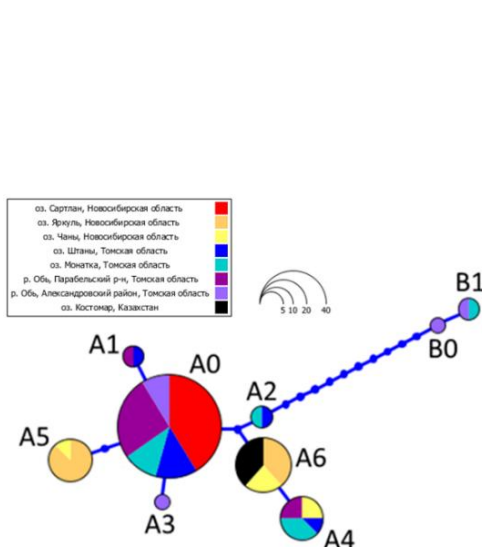


Рисунок 11. Взаимоотношения между гаплотипами серебряного карася, полученные с использованием программы HaploTypeViewer. Гаплотип A5 отличается от A0 единственной делецией в 18 п.н.

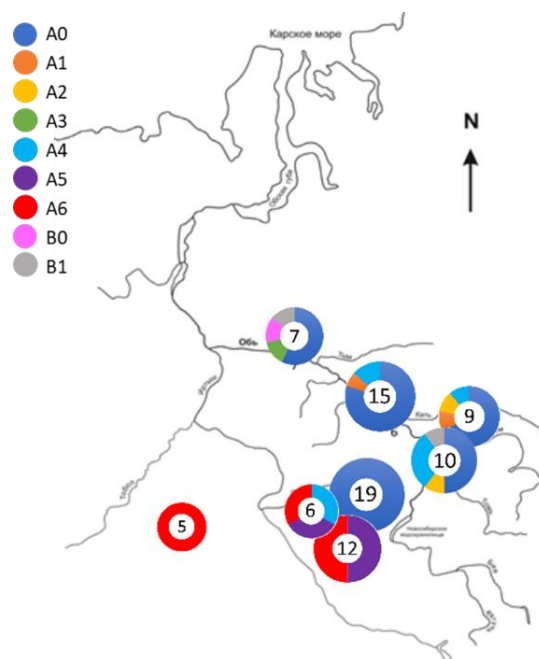


Рисунок 12. Распределение гаплогрупп серебряного карася в Обь-Иртышском бассейне. В круговых диаграммах указано количество особей, полученных из данного региона.

Мы наблюдаем в популяции серебряного карася более низкое генетическое разнообразие, чем в популяциях осетровых. Несмотря на то, что этот вид не находится под угрозой исчезновения, наши данные свидетельствуют об «эффекте основателя», либо о произошедшем событии «бутылочного горлышка» в популяциях серебряного карася в Средней Оби. Вероятно, это связано с недавними инвазиями амурского карася в эти водоемы (Interesova 2016).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Виды – объекты проведенных нами исследований являются не совсем типичными представителями своего класса. Стерлядь и сибирский осетр из семейства осетровых независимо прошли несколько раундов полной дупликации генома, характеризуются низкой скоростью молекулярной, биохимической и морфологической эволюции. Серебряный карась имеет формы с разным уровнем пloidности, а также образует гибриды с близкими видами, что приводит к еще более сложной идентификации статуса этого вида. Все

3 изучаемых вида имеют большое значение в рыбном промысле, и являются важными аквакультурными объектами. Выявление генетических особенностей этих видов позволит создать предпосылки для развития высокотехнологичной аквакультуры и для планирования природоохранных мероприятий.

Мы провели анализ митохондриальной ДНК, которая представляет только материнские линии этих трех видов. Наши данные вносят большой вклад в описание генетической структуры популяций стерляди, сибирского осетра и серебряного карася. Исследование ядерных маркеров и увеличение выборок археологических образцов позволит расширить знания о разнообразии популяций и демографической истории ценных промысловых видов. В будущем необходимо проведение популяционных исследований, основанных на полногеномных данных.

ВЫВОДЫ

1. Филогенетический анализ контрольного района мтДНК выявил в реках северной Евразии ранее не описанные мт-гаплотипы: 103 для стерляди (*A. ruthenus*), 61 для сибирского осетра (*A. baerii*) и 3 для серебряного карася (*C. gibelio*).
2. В популяции серебряного карася в Средней Оби наблюдается невысокое генетическое разнообразие ($P_i=0,0035$, $H_d=0,656$) и отмечено влияние процессов эффекта основателя.
3. Сравнение популяционных характеристик стерляди (*A. ruthenus*) и сибирского осетра (*A. baerii*) показало, что генетическое разнообразие стерляди ($P_i=0,023$, $H_d=0,95$) почти в 10 раз выше, чем сибирского осетра ($P_i=0,0056$, $H_d=0,83$), что говорит о более уязвимом статусе вида *A. baerii*.
4. При исследовании структур популяций стерляди (*A. ruthenus*) и сибирского осетра (*A. baerii*) в разных речных бассейнах установлено, что внутри одного бассейна вид представлен единой популяцией, а популяции разных бассейнов в большинстве случаев изолированы. В популяции серебряного карася (*C. gibelio*) в бассейне Средней Оби наблюдается процесс замещения автохтонных форм интродуцированными.
5. Изучение ископаемых образцов стерляди в бассейне Волги показало доминирование гаплогрупп С, Е и F, и отсутствие гаплогрупп А, D, I, J, K и L, которые преобладают в восточной части ареала.
6. Популяционный анализ показал, что в популяциях стерляди около 100 тысяч лет назад произошло событие «бутылочного

горлышка». Для сибирского осетра не обнаружено резкого изменения численности в течение последних 2 млн лет.

7. Рассчитано время расхождения гаплогрупп для стерляди и сибирского осетра. Клады гаплогрупп стерляди разошлись около 9 млн лет назад, расхождение гаплогрупп внутри клад происходило в период от 4 до 7 млн лет назад. Расхождение основных гаплогрупп сибирского осетра произошло около 5 млн лет назад, а расхождение внутри гаплогрупп происходило от 0,5 до 2 млн лет назад. Анализ полных митохондриальных геномов представителей основных гаплогрупп осетровых подтвердил топологию филогенетического дерева.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Pobedintseva MA**, Makunin AI, Kichigin IG, Kulemzina AI, Serdyukova NA, Romanenko SA, Vorobieva NV, Interesova EA, Korentovich MA, Zaytsev VF, Mischenko AV, Zadelenov VA, Yurchenko AA, Sherbakov DY, Graphodatsky AS, Trifonov VA. Population genetic structure and phylogeography of sterlet (*Acipenser ruthenus*, Acipenseridae) in the Ob and Yenisei river basins. Mitochondrial DNA A. 2019; 30(1):156-164.

2. **М.А. Побединцева**, С.Н. Решетникова, Н.А. Сердюкова, А. Бишани, В.А. Трифонов, Е.А. Интересова. Генетическая гетерогенность серебряного карася *Carassius gibelio* (Cyprinidae) в бассейне Средней Оби. Генетика, 2021, том 57, № 4, с. 429–436.

3. **М.А. Pobedintseva**, I.V. Askeyev, O.V. Askeyev, A.O. Askeyev, S.P. Monakhov, D.N. Shaymuratova, A.S. Molodtseva, S.F. Kliver, V.A. Trifonov. Genetic diversity of ancient sterlet (*Acipenser ruthenus*) populations from the Volga basin. Submitted.

4. **Побединцева М.А.**, Макунин А.И., Дружкова А.С., Сердюкова Н.А., Воробьева Н.В., Интересова Е.А., Графодатский А.С., Трифонов В.А. Молекулярная филогения гаплогрупп стерляди (*Acipenser ruthenus*) и сибирского осетра (*A. baerii*), основанная на анализе полных митохондриальных геномов. Acta Naturae. 2017; Спецвыпуск №1, Т. 9, С. 78.

5. **М.А. Побединцева**, И.Г. Кичигин, С.А. Романенко, А.И. Кулемзина, Н.В. Воробьева, Н.А. Сердюкова, Е.А. Интересова, М.А. Корентович, В.Ф. Зайцев, А.И. Макунин, А.С. Графодатский, В.А. Трифонов. Филогеография осетровых (Acipenseridae) в реках Сибири. Материалы V научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса», Москва, 2017. – С. 220-221.

6. **Побединцева М.А.** Генетическое разнообразие древней и современной стерляди (*Acipenser ruthenus*) в бассейне Волги. Материалы XXV

международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2018.

7. **М. А. Побединцева.** Популяционная генетика осетровых Сибири. Материалы Международной конференции «Хромосома 2018». – Новосибирск, 2018. – С. 156-157.

8. **Pobedintseva M.**, Makunin A., Kichigin I., Serdyukova N., Interesova E., Zadelenov V., Yurchenko A., Shcherbakov D., Grafodatskiy A., Trifonov V. Population Genetics Of Acipenseridae In Siberian Rivers. Abstract book of the 3RD International Conference «Smart Bio», 02-04 May 2019. Kaunas, Lithuania. P. 200.