

УДК 575.17:597.442

ПРИРОДНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ СИБИРСКОГО ОСЕТРА *Acipenser baerii* Brandt, 1869

© 2017 г. А. Е. Барминцева^{1,2,*}, Н. С. Мюге^{1,2,**}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва 107140

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва 119334

*e-mail: bae69@mail.ru

**e-mail: mugue@mail.ru

Поступила в редакцию 04.05.2016 г.

Представлены результаты исследования генетического полиморфизма пяти популяций сибирского осетра *Acipenser baerii*, собранных на всем ареале вида (оз. Байкал, реки Лена, Енисей, Колыма, Обь и Иртыш) по пяти тетраплоидным микросателлитным локусам и контрольному региону митохондриальной ДНК. Показано, что сибирский осетр представлен генетически хорошо различающимися группировками, соответствующими гидрографическим бассейнам, — Обь-Иртышская, Байкало-Енисейская, Ленская и Колымская. При получении и выпуске молоди сибирского осетра для искусственного воспроизводства необходимо учитывать популяционную принадлежность производителей.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, мт-гаплотип, контрольный регион, микросателлитный анализ, генетический полиморфизм.

DOI: 10.7868/S001667581703002X

Сибирский осетр *A. baerii* Brandt, 1869 является потамодромным видом, широко распространенным во всех крупных реках Сибири от Оби до Колымы, а также в оз. Байкал.

Описан этот вид Брандтом из рек Обь и Лена [1], позднее Никольским описан отдельный вид — узкорылый осетр *A. stenorhynchus* из р. Енисей и байкальская форма узкорылого осетра *A. stenorhynchus* var. *baikalensis* [2]. В последующие годы проводились многочисленные ревизии, в результате в настоящее время принято деление сибирского осетра на три подвида — *A. b. baerii* (Обь-Иртышский бассейн), *A. b. stenorhynchus* (реки Енисей, Лена и реки к востоку от Лены до рек Колыма и Индигирка) и *A. b. baikalensis* (оз. Байкал и впадающие в него реки Селенга и Верхняя Ангара) [3]. Дальнейшее изучение сибирского осетра показало значительную внутривидовую морфологическую изменчивость при отсутствии выраженных различий между осетрами Оби, Енисея и Лены, что послужило основанием распространенного мнения о необоснованности выделения подвигов [4–6]. Эти данные были подтверждены изучением полиморфизма митохондриальной ДНК — при выявленной изменчивости по участку контрольного региона показано отсутствие изменчивости по “баркодинговому участку” гена *COI* [7].

Катастрофическое снижение запасов осетровых в последние три десятилетия, вызванное не-

рациональным и нелегальным промыслом, зарегулированием рек, исчезновением привычных нерестилищ и загрязнением водоемов, не обошло стороной и популяцию сибирского осетра, который еще в 30-х годах XX в. обеспечивал ежегодные уловы в несколько тысяч тонн [8], но сегодня в связи с малой численностью не имеет промыслового значения. В настоящее время вид включен в перечень особо ценных диких животных и водных биологических ресурсов, утвержденный Постановлением Правительства Российской Федерации от 13.10.2013, а байкальская и обская популяции сибирского осетра занесены в Красную книгу Российской Федерации [9].

Сибирский осетр принадлежит к объектам действия международных соглашений и конвенций, ратифицированных Российской Федерацией — занесен в Приложение II СИТЕС (Конвенция ООН “О международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой уничтожения”) [10–12], а также включен в Красный список МСОП со статусом ENA2d (вид в угрожаемом состоянии с резко сокращающейся численностью в результате эксплуатации) [13].

Исследование природного генетического полиморфизма сибирского осетра имеет непосредственное значение как для разработки мер по охране и восстановлению природных популяций этого вида, так и для развития аквакультуры. Несмотря на то что деление сибирского осетра на

Таблица 1. Характеристика исследованного материала сибирского осетра из природных популяций

| № | Популяция | Природный источник | Число особей |
|-------|---------------|--------------------|--------------|
| 1 | Ленская | р. Лена | 48 |
| 2 | Байкальская | оз. Байкал | 24 |
| 3 | Обь-Иртышская | р. Обь и р. Иртыш | 38 |
| 4 | Енисейская | р. Енисей | 20 |
| 5 | Колымская | р. Колыма | 21 |
| Итого | | | 151 |

подвиды в современной литературе оспаривается [14], при проведении работ по искусственному воспроизводству необходимо поддержание и сохранение генетического полиморфизма каждой популяции. Целью настоящей работы является анализ природного генетического полиморфизма митохондриальной и ядерной ДНК сибирского осетра на основании материала, собранного по всему ареалу его обитания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследована 151 особь сибирского осетра из пяти природных популяций – бассейнов рек Обь (и приток Оби р. Иртыш), Енисей, Лена, Колыма и оз. Байкал. Также исследовались доместифицированные (выловленные в природной среде) особи с документированным происхождением. Сборы материала были проведены в течение 2004–2015 гг. и депонированы в РНКЭГМ (Российская национальная коллекция эталонных генетических материалов, свидетельство о регистрации базы данных № 2006620351 от 03.11.2006) во ВНИРО, где каждому образцу присваивался идентификационный номер. Исследованный материал представлен в табл. 1.

Пробы осетровых рыб отбирали прижизненным методом отрезания фрагмента спинного или грудного плавника, образцы были зафиксированы в 96%-ном этиловом спирте на месте сбора материала.

Выделение и последующую очистку ДНК из плавников осетровых рыб проводили на адсорбционных колонках PALL 5051 (AcroPrep™ 96 1 ml filter plate with 1.0 µm Glass Fibermedia, natural housing) в соответствии с протоколом Канадского центра по ДНК-штрихкодированию (http://www.ccdb.ca/docs/CCDB_DNA_Extraction.pdf) [15]. Водный раствор ДНК хранили при –20°C до использования.

Анализ полиморфизма митохондриальной ДНК проводили методом ПЦР с использованием праймеров DL651 (ATCTTAACATCTTCAGTG) и M13AHR3 (TCACACAGGAAACAGCTATGACATACCATAATGTTTCATCTACC) [16]. ПЦР содержала около 100 нг ДНК в объеме 15 мкл (70 мМ

трис-НCl (pH 8.3), 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgCl₂, по 100 мкМ dNTP, по 1.5 пкМ каждого из праймеров, 1 ед. *ColarTaq*-полимеразы (Силекс, Москва)). Амплификацию проводили по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 95°C – 10 мин; синтез ПЦР-продуктов (30 циклов): плавление 94°C – 20 с, отжиг праймеров 52°C – 40 с, синтез ДНК 72°C – 60 с; окончательная достройка цепей 72°C – 10 мин. Визуализацию продуктов ПЦР осуществляли в 2%-ном агарозном геле в 0.5× TBE буфере с окрашиванием бромистым этидием. Секвенирование контрольного региона митохондриальной ДНК проводилось с одной цепи с универсального праймера M13(-22) (5 пкМ) на ABI 3500 Genetic analyzer, с использованием набора реактивов BigDye™ Terminator Kit v. 3.1 (Applied Biosystems, USA) в объеме реакции 10 мкл и с использованием прилагающегося к набору 5× реакционного буфера (в предварительно осажденный в 96-луночном планшете ПЦР-продукт добавляется реакционная смесь: BigDye – 0.25 мкл, 5× BigDye буфер – 1.7 мкл, праймер M13(-22) – 3 пкМ, вода до 10 мкл). Анализ и выравнивание последовательностей проводились с помощью биоинформационного пакета программ SeqMan® Version 12.0, DNASTAR, Madison, WI, США. Гаплотипная сеть построена с помощью программы TCS [17], анализ межпопуляционной изменчивости осуществлялся методом AMOVA, реализованным в программе Arlequin v. 3.5 [18]. Анализ попарных расстояний (mismatch distribution) проводили в программах Arlequin и DNAsp [19].

Для микросателлитного анализа использовали набор из пяти локусов (Afug41, Afug51, An20, AoxD161, AoxD165), ранее опубликованных для других видов осетровых [20–22]. Данные пять локусов были отобраны по результатам предварительного тестирования большого числа (более 20) локусов по принципу высокой воспроизводимости амплификации, наибольшего полиморфизма, соответствия равновесию Харди–Вайнберга и отсутствия нуль-аллелей у большинства видов, обитающих в России [23].

Реакции амплификации проводили в конечном объеме 15 мкл (70 мМ трис-НCl (pH 8.6); 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄; 1.8 мМ MgCl₂; по 200 мкМ каждого

dNTP; 1 пкМ праймера, модифицированного на 5'-конце флуоресцентным красителем FAM, HEX или TAMRA; 4 пкМ обратного (немеченного) праймера; 50–100 нг ДНК; 0.8 ед. *Taq*-полимеразы (Силекс, Москва) по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 94°C – 1 мин; восемь циклов: плавление 95°C – 20 с, отжиг праймеров – 58°C в первом цикле (25 с) и в каждом последующем цикле температура отжига снижалась на 0.5°C, синтез ДНК 65°C – 40 с; 25 циклов: плавление 95°C – 20 с, отжиг праймеров 54°C – 30 с, синтез ДНК 65°C – 40 с; досинтез ДНК при 65°C – 10 мин. Полученную ПЦР смесь разбавляли в 3 раза водой (milliQ), затем по 1 мкл разбавленной реакции переносили в 12 мкл формамида NiDi с добавленным молекулярным стандартом для определения размера амплифицируемых фрагментов ДНК. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в системе капиллярного электрофореза ABI 3130 Genetic analyzer, определение длин аллелей осуществляли с применением программного обеспечения GeneMarker (Version 1.2). Определение вероятности принадлежности особей к каждой из предполагаемых популяций проводилось в программе Structure 2.3.3 [24]. Статистические данные (F_{ST} , частоты аллелей) получены с помощью программ Polysat и SPAGeDi (Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity), которые позволяют работать с полиплоидами [25, 26], построение PCA проводилось в GenAlex [27] по полученным в SPAGeDi значениям F_{ST} .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование митохондриальной ДНК

Нами исследованы последовательности контрольного региона мтДНК длиной 685 пн. Всего у 151 особи сибирского осетра из пяти популяций выявлено 50 различных митохондриальных гаплотипов (депонированы в GenBank NCBI под номерами KU375049–KU375098), из которых семь являются общими для разных популяций (представлены в двух–пяти популяциях), остальные представлены только в одной. Распределение гаплотипов по популяциям показано в табл. 2.

На основании полученных данных была построена сеть гаплотипного разнообразия популяций сибирского осетра (рис. 1).

В обь-иртышской популяции выявлено 22 гаплотипа (17 уникальных и пять общих с другими популяциями). Енисейская популяция характеризуется восьмью гаплотипами – 5 уникальных и три – в общих гаплотипах. Ленская популяция характеризуется 16 гаплотипами, из них 14 уникальных, а также имеет долю в двух общих гаплотипах. Колымская популяция представлена только двумя гаплотипами и оба являются общими

для других популяций. В байкальской популяции выявлено 14 мт-гаплотипов, из которых семь уникальны для данной популяции. Также байкальские гаплотипы представлены во всех семи гаплотипах, являющихся общими в двух и более популяциях сибирского осетра, что позволяет предположить историческую связь современной популяции оз. Байкал со всеми исследованными нами популяциями.

В обь-иртышской и байкальской популяциях наблюдается наибольшее гаплотипное и нуклеотидное разнообразие, наименьшие значения выявлены в популяции р. Колыма (табл. 3). Анализ дифференциации исследованных популяций сибирского осетра показал, что все популяции значимо отличаются друг от друга по критерию F_{ST} , за исключением обь-иртышской и байкальской популяций (табл. 4). Парные межгаплотипные дистанции также свидетельствуют о пониженном генетическом разнообразии популяции р. Колыма (среднее число замен между гаплотипами внутри популяции $PiX = 0.97143$), в то время как наибольшее значение дистанций между гаплотипами в популяции оз. Байкал ($PiX = 4.011$). Полиморфные нуклеотидные сайты фрагмента контрольного региона мтДНК сибирского осетра представлены в табл. 5.

Анализ полиморфизма микросателлитных локусов

Все используемые локусы показали высокую полиморфность для исследуемых популяций сибирского осетра. Количество выявленных аллелей для каждого локуса и количество аллелей на особь указано в табл. 6.

Исследование генетической структуры сибирского осетра с применением микросателлитных маркеров указывает на отсутствие мажорных диагностических аллелей, специфичных для какой-либо из природных популяций (табл. 7).

В то же время результаты assignment test, проведенного в программе Structure, указывают, что популяции имеют значимую дифференциацию между собой, хотя распределение выборок по группам не соответствует принятому делению этого вида на оз. Байкал и бассейны сибирских рек – Обь-Иртышский бассейн, Енисей, Лена и Колыма.

При проведении кластерного анализа с параметрами (no admixture, no priors) при $k = 3$ (рис. 2,а) четко обособленные популяционные кластеры образуют ленская и обь-иртышская популяции, а популяции Енисея, Байкала и Колымы объединяются в один.

При увеличении числа кластеров ($k = 4$ и $k = 5$) в отдельный кластер обособляется популяция р. Колыма, а среди особей из популяций р. Енисей и оз. Байкал начинают выделяться два кластера, не соответствующих популяционной принад-

Таблица 2. Распределение выявленных гаплотипов сибирского осетра в исследованных природных популяциях

| № | Гаплотип | Популяция | Число особей | № | Гаплотип | Популяция | Число особей | | | | | | |
|----|----------|---------------|--------------|----|----------|---------------|--------------|-------------|--------|---------------|--------|-------------|--------|
| 1 | ВаеН1 | Обь-Иртышская | 1 | 24 | ВаеН25 | Ленская | 2 | | | | | | |
| 2 | ВаеН2 | Енисейская | 1 | 25 | ВаеН26 | Ленская | 1 | | | | | | |
| 3 | ВаеН3 | Ленская | 11 | 26 | ВаеН29 | Байкальская | 1 | | | | | | |
| | | Байкальская | 2 | 27 | ВаеН30 | Обь-Иртышская | 1 | | | | | | |
| 4 | ВаеН4 | Обь-Иртышская | 5 | 28 | ВаеН31 | Байкальская | 1 | | | | | | |
| | | Байкальская | 2 | 29 | ВаеН32 | Байкальская | 4 | | | | | | |
| 5 | ВаеН5 | Обь-Иртышская | 9 | | | 30 | ВаеН33 | Енисейская | 4 | | | | |
| | | Енисейская | 4 | 31 | ВаеН34 | | | Байкальская | 1 | | | | |
| | | Байкальская | 1 | | | | | 32 | ВаеН35 | Байкальская | 4 | | |
| 7 | ВаеН7 | Ленская | 14 | 33 | ВаеН36 | Обь-Иртышская | 1 | | | | | | |
| | | Обь-Иртышская | 3 | | | 34 | ВаеН37 | Колымская | 17 | | | | |
| | | Колымская | 4 | | | | | 35 | ВаеН38 | Обь-Иртышская | 2 | | |
| | | Енисейская | 6 | | | | | | | 36 | ВаеН39 | Байкальская | 1 |
| | | Байкальская | 2 | | | | | | | | | 37 | ВаеН40 |
| 8 | ВаеН8 | Байкальская | 2 | 38 | ВаеН42 | Енисейская | 1 | | | | | | |
| 9 | ВаеН9 | Обь-Иртышская | 1 | 39 | ВаеН43 | Ленская | 1 | | | | | | |
| 10 | ВаеН10 | Обь-Иртышская | 1 | 40 | ВаеН44 | Обь-Иртышская | 1 | | | | | | |
| 11 | ВаеН11 | Ленская | 1 | 41 | ВаеН45 | Обь-Иртышская | 1 | | | | | | |
| 12 | ВаеН12 | Енисейская | 2 | 42 | ВаеН47 | Обь-Иртышская | 2 | | | | | | |
| 13 | ВаеН13 | Обь-Иртышская | 1 | 43 | ВаеН48 | Обь-Иртышская | 1 | | | | | | |
| 14 | ВаеН14 | Ленская | 1 | 44 | ВаеН49 | Ленская | 7 | | | | | | |
| 15 | ВаеН15 | Ленская | 1 | 45 | ВаеН50 | Ленская | 1 | | | | | | |
| 16 | ВаеН16 | Обь-Иртышская | 1 | 46 | ВаеН51 | Обь-Иртышская | 1 | | | | | | |
| 17 | ВаеН17 | Ленская | 3 | 47 | ВаеН52 | Енисейская | 1 | | | | | | |
| 18 | ВаеН18 | Обь-Иртышская | 1 | 48 | ВаеН53 | Обь-Иртышская | 1 | | | | | | |
| 19 | ВаеН19 | Ленская | 1 | 49 | ВаеН54 | Ленская | 1 | | | | | | |
| 20 | ВаеН20 | Ленская | 1 | 50 | ВаеН55 | Обь-Иртышская | 1 | | | | | | |
| 21 | ВаеН21 | Ленская | 1 | | | | | | | | | | |
| 22 | ВаеН22 | Обь-Иртышская | 1 | | | | | | | | | | |
| 23 | ВаеН24 | Енисейская | 1 | | | | | | | | | | |

Таблица 3. Характеристика гаплотипного и нуклеотидного разнообразия исследованных популяций сибирского осетра

| Показатель | Обь-Иртыш | Енисей | Байкал | Лена | Колыма |
|--|------------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| Количество особей | 38 | 20 | 24 | 48 | 21 |
| Число мт-гаплотипов | 22 | 8 | 14 | 16 | 2 |
| Число полиморфных сайтов | 38 | 12 | 18 | 32 | 3 |
| Гаплотипное разнообразие (H), % | 92.75 ± 2.95 | 85.26 ± 4.90 | 94.2 ± 2.74 | 84.84 ± 3.29 | 32.38 ± 10.82 |
| Нуклеотидное разнообразие (π), % | 0.59 ± 0.34 | 0.5 ± 0.3 | 0.61 ± 0.35 | 0.36 ± 0.22 | 0.14 ± 0.11 |

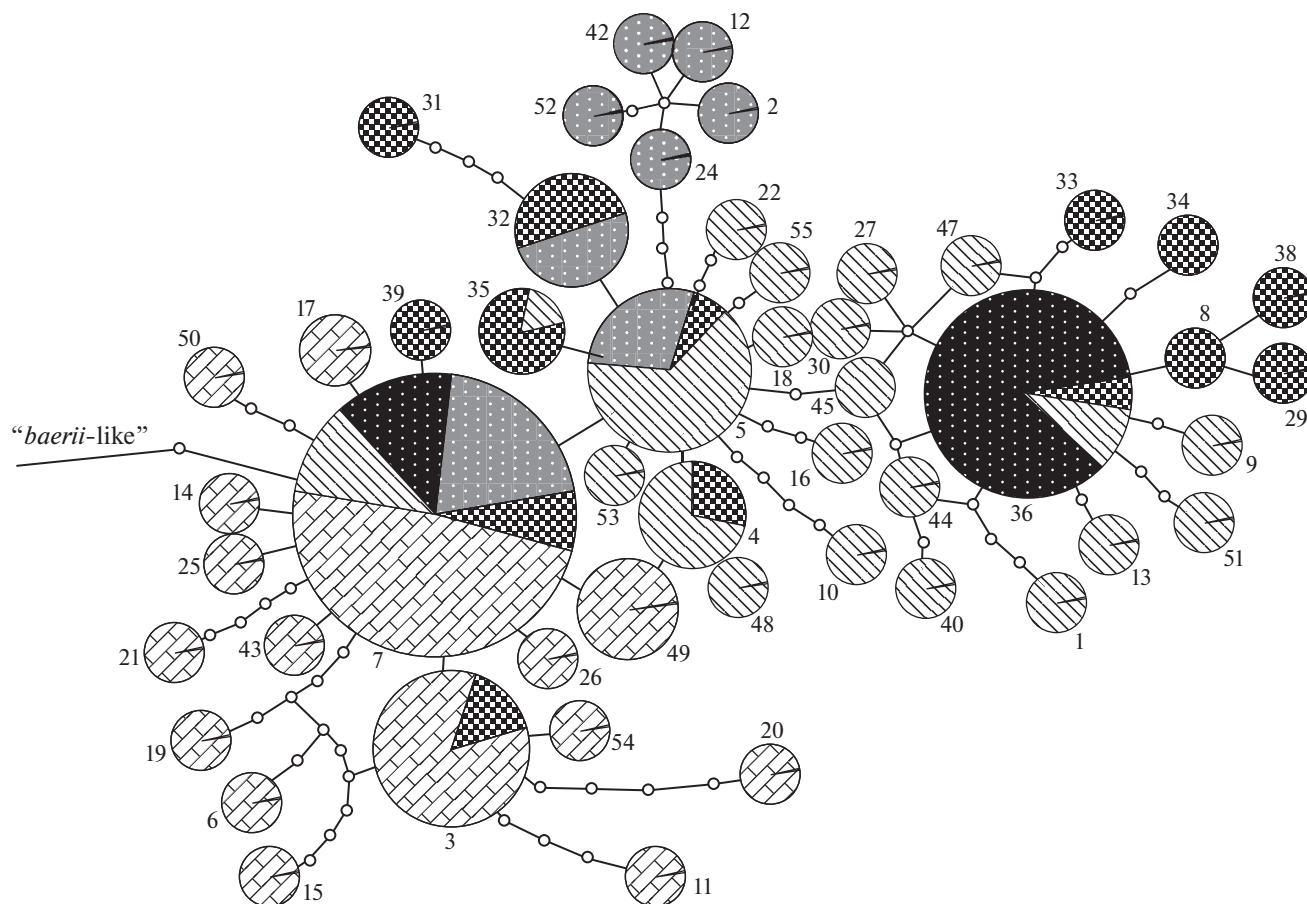


Рис. 1. Сеть гаплотипов исследованных выборок пяти природных популяций сибирского осетра (р. Лена – белые кирпичики; оз. Байкал – шахматный узор; р. Колыма – белые точки на черном фоне; р. Енисей – белые точки на сером фоне; р. Обь – черные полосы на белом фоне). Ветвь, обозначенная “*baerii-like*”, направлена к одноименному кластеру гаплотипов русского осетра *A. gueldenstaedtii* каспийской популяции (на рисунке не представлены). Цифры – номера мт-гаплотипов.

лежности (рис. 2, б, в). Таким образом, популяции из Енисея и Байкала не разделяются между собой ни при каких значениях *k*. При анализе только двух выборок (Енисей и Байкал) при различных *k* не происходит разделения на кластеры, соответствующие популяционной принадлежности (данные не представлены), что свидетельствует о не-

достаточной генетической дифференциации популяций Байкала и Енисея.

Значение F_{ST} по данным микросателлитного анализа варьируют от 0.012 между популяциями Байкала и Енисея до 0.064 между популяциями Оби и Лены (табл. 8). Анализ главных компонент

Таблица 4. Значения генетических дистанций (F_{ST} , над диагональю), среднее число замен между гаплотипами внутри популяции (PiX, диагональ) и скорректированное среднее число нуклеотидных замен $((PiXY - (PiX + PiY))/2)$, под диагональю) между исследованными природными популяциями сибирского осетра по данным анализа мтДНК

| Популяции | Обь-Иртыш | Енисей | Байкал | Лена | Колыма |
|-----------|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Обь-Иртыш | 3.935 | 0.142(***) | 0.013(NS) | 0.208(***) | 0.289(***) |
| Енисей | 0.625 | 3.300 | 0.128(***) | 0.197(***) | 0.537(***) |
| Байкал | 0.053 | 0.545 | 4.011 | 0.176(***) | 0.290(***) |
| Лена | 0.803 | 0.637 | 0.606 | 2.393 | 0.511(***) |
| Колыма | 1.211 | 2.443 | 1.070 | 2.080 | 0.971 |

Примечание. NS – статистическая значимость отсутствует; *** – статистическая значимость при $p < 0.001$.

Таблица 6. Аллельное разнообразие исследованных микросателлитных локусов среди популяций сибирского осетра

| Популяция | An20 | | AoxD165 | | Afug41 | | Afug51 | | AoxD161 | |
|---------------|--------|------------------|---------|------------------|--------|------------------|--------|------------------|---------|------------------|
| | Аллели | Гетерозиготность | Аллели | Гетерозиготность | Аллели | Гетерозиготность | Аллели | Гетерозиготность | Аллели | Гетерозиготность |
| Лена | 9 | 3.08 | 8 | 2.27 | 11 | 3.31 | 5 | 2.05 | 9 | 3.40 |
| Енисей | 11 | 3.25 | 10 | 3.30 | 14 | 3.75 | 10 | 2.05 | 9 | 3.30 |
| Байкал | 11 | 3.10 | 8 | 3.04 | 9 | 3.09 | 6 | 2.90 | 8 | 3.45 |
| Обь | 7 | 2.94 | 12 | 3.16 | 6 | 3.23 | 4 | 2.60 | 8 | 2.90 |
| Колыма | 7 | 3.19 | 9 | 3.14 | 13 | 3.29 | 12 | 2.38 | 8 | 3.29 |
| Все популяции | 11 | 3.09 | 15 | 2.92 | 18 | 3.31 | 16 | 2.38 | 11 | 3.25 |

Применение. Слева – количество аллелей на локус, справа – количество аллелей на особь.

по результатам значений F_{ST} исследованных выборок сибирского осетра представлен на рис. 3. Популяции Байкала и Енисея практически неотличимы, в то время как популяции Обь-Иртышского бассейна и Лены разнесены в пространстве первой и второй (рис. 3,а), а популяция р. Колыма четко обособляется в пространстве первой и третьей (рис. 3,б) компонент.

ОБСУЖДЕНИЕ

Предыдущие исследования мтДНК показали, что сибирский осетр образует близкородственный кластер с такими видами как русский, адриатический и персидский осетры [28–31] и имеет

понтно-каспийское происхождение. Миграция из каспийского в арктический бассейн (по данным анализа гена *CytB* – в начале миоцена [32]) привела к вселению предков сибирского осетра в реки арктического бассейна и с тех пор сибирский осетр сформировался как вид, четко отличающийся от русского осетра как по морфологическим признакам, так и по эколого-биологическим характеристикам.

По результатам исследования митохондриальной ДНК во всех популяциях встречается по 2–3 массовых (мажорных) гаплотипа, а также большое число уникальных гаплотипов, отличающихся от массового на одну или несколько мутаций. Можно предположить, что наиболее часто встре-

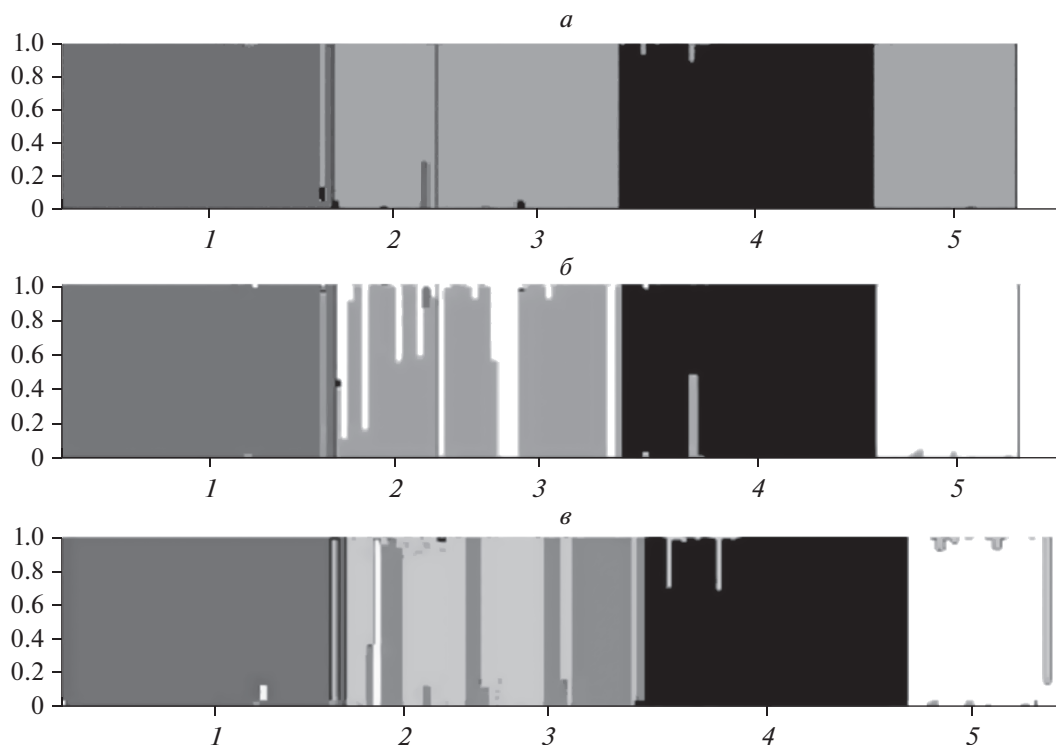


Рис. 2. Кластерный анализ, проведенный в программе Structure (1 – популяция р. Лена, 2 – популяция р. Енисей, 3 – популяция оз. Байкал, 4 – обь-иртышская популяция, 5 – популяция р. Колыма), при $k = 3$ (а), при $k = 4$ (б), при $k = 5$ (в).

Таблица 7. Частоты встречаемости аллелей пяти микросателлитных локусов в природных популяциях сибирского осетра

| Ап20 | 145 | 149 | 153 | 157 | 161 | 165 | 169 | 173 | 177 | 181 | 185 | 200 | 204 | 206 | 208 | 230 | 237 | 241 | 245 | 249 | 253 | 257 | 261 |
|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Общая для вида | 0.03 | 0.06 | 0.01 | 0.11 | 0.27 | 0.23 | 0.14 | 0.05 | 0.01 | 0.02 | 0.08 | 0.06 | 0.02 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Лена | 0.01 | 0.06 | 0.01 | 0.16 | 0.35 | 0.12 | 0.24 | 0.05 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Енисей | 0.05 | 0.03 | 0.02 | 0.23 | 0.10 | 0.10 | 0.15 | 0.13 | 0.03 | 0.03 | 0.12 | 0.05 | 0.03 | 0 | 0.02 | | | | | | | | |
| Байкал | 0.01 | 0.03 | 0.04 | 0.07 | 0.19 | 0.36 | 0.14 | 0.06 | 0.03 | 0.06 | 0.01 | 0.06 | 0.05 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Обь | 0.03 | 0 | 0 | 0.04 | 0.28 | 0.35 | 0.01 | 0.04 | 0 | 0 | 0.24 | 0.03 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Кольма | 0.08 | 0.190 | 0 | 0.10 | 0.33 | 0.13 | 0.15 | 0.01 | 0 | 0 | 0 | 0.17 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| АохД161 | 102 | 106 | 110 | 114 | 118 | 122 | 126 | 130 | 134 | 138 | 146 | 196 | 204 | 206 | 208 | | | | | | | | |
| Общая для вида | 0.17 | 0.04 | 0.24 | 0.02 | 0 | 0.14 | 0.11 | 0.11 | 0.16 | 0 | 0.01 | 0.06 | 0.02 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Лена | 0.09 | 0.01 | 0.24 | 0 | 0.01 | 0.21 | 0.20 | 0.09 | 0.11 | 0 | 0.03 | 0.06 | 0.02 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Енисей | 0.10 | 0.13 | 0.23 | 0.02 | 0 | 0.03 | 0.07 | 0.22 | 0.18 | 0.02 | 0 | 0.05 | 0.03 | 0 | 0.02 | | | | | | | | |
| Байкал | 0.22 | 0.05 | 0.21 | 0.05 | 0 | 0.08 | 0.09 | 0.19 | 0.10 | 0 | 0 | 0.06 | 0.05 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Обь | 0.17 | 0.01 | 0.29 | 0.02 | 0 | 0.22 | 0.02 | 0.02 | 0.25 | 0 | 0 | 0.03 | 0.01 | 0 | 0.01 | | | | | | | | |
| Кольма | 0.32 | 0.04 | 0.18 | 0 | 0 | 0.05 | 0.17 | 0.11 | 0.13 | 0 | 0.01 | 0.25 | 0.02 | 0.01 | 0 | | | | | | | | |
| АохД165 | 168 | 172 | 174 | 176 | 178 | 180 | 182 | 184 | 188 | 192 | 196 | 276 | 280 | 284 | 292 | | | | | | | | |
| Общая для вида | 0 | 0 | 0.02 | 0.07 | 0.09 | 0.31 | 0 | 0.01 | 0.09 | 0.09 | 0.22 | 0.15 | 0 | 0.18 | 0.01 | | | | | | | | |
| Лена | 0 | 0 | 0 | 0.02 | 0 | 0.55 | 0 | 0.04 | 0.11 | 0.02 | 0.23 | 0.14 | 0 | 0.45 | 0.05 | | | | | | | | |
| Енисей | 0 | 0 | 0 | 0.05 | 0.10 | 0.37 | 0 | 0.02 | 0.10 | 0.18 | 0.08 | 0.17 | 0.03 | 0.03 | 0 | | | | | | | | |
| Байкал | 0 | 0 | 0 | 0.20 | 0.10 | 0.34 | 0 | 0 | 0.11 | 0.08 | 0.06 | 0.14 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Обь | 0.01 | 0.01 | 0 | 0.06 | 0.19 | 0.11 | 0.01 | 0 | 0.03 | 0.18 | 0.35 | 0.18 | 0 | 0 | 0.01 | | | | | | | | |
| Кольма | 0 | 0 | 0.14 | 0 | 0.10 | 0.10 | 0 | 0 | 0.14 | 0.04 | 0.25 | 0.20 | 0.02 | 0.01 | 0 | | | | | | | | |
| Афг51 | 232 | 236 | 240 | 244 | 248 | 252 | 256 | 260 | 264 | 268 | 272 | 276 | 280 | 284 | 292 | 300 | | | | | | | |
| Общая для вида | 0.01 | 0 | 0.01 | 0 | 0.02 | 0.06 | 0.27 | 0.10 | 0.03 | 0.06 | 0.09 | 0.15 | 0 | 0.18 | 0.01 | 0 | | | | | | | |
| Лена | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.35 | 0 | 0 | 0 | 0.14 | 0 | 0.45 | 0.05 | | | | | | | | |
| Енисей | 0.02 | 0 | 0 | 0 | 0.02 | 0.15 | 0.18 | 0 | 0.10 | 0.05 | 0.25 | 0.17 | 0.03 | 0.03 | 0 | | | | | | | | |
| Байкал | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.09 | 0.20 | 0.29 | 0 | 0.07 | 0 | 0.20 | 0.14 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Обь | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.59 | 0 | 0 | 0 | 0.05 | 0.18 | 0 | 0.18 | 0 | | | | | | | | |
| Кольма | 0.04 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.25 | 0 | 0.01 | 0.38 | 0.10 | 0.12 | 0 | 0.01 | 0 | | | | | | | | |
| Афг41 | 173 | 197 | 201 | 205 | 209 | 213 | 217 | 221 | 225 | 229 | 233 | 237 | 241 | 245 | 249 | 253 | | | | | | | |
| Общая для вида | 0 | 0.17 | 0.01 | 0.01 | 0.14 | 0.03 | 0.09 | 0.06 | 0.18 | 0.13 | 0.08 | 0.06 | 0.02 | 0.02 | 0 | 0 | | | | | | | |
| Лена | 0 | 0.20 | 0.00 | 0.01 | 0.14 | 0.01 | 0.19 | 0.04 | 0.28 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.06 | 0.04 | 0 | 0 | | | | | | | |
| Енисей | 0.03 | 0.05 | 0.07 | 0.07 | 0.13 | 0.12 | 0.05 | 0.00 | 0.15 | 0.08 | 0.07 | 0.10 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0 | | | | | | | |
| Байкал | 0 | 0.15 | 0 | 0 | 0.10 | 0.05 | 0.11 | 0.19 | 0.18 | 0.06 | 0.10 | 0.06 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | |
| Обь | 0 | 0.14 | 0 | 0 | 0.14 | 0 | 0 | 0 | 0.05 | 0.40 | 0.16 | 0.10 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | |
| Кольма | 0 | 0.26 | 0 | 0 | 0.15 | 0.04 | 0.10 | 0.05 | 0.21 | 0 | 0.04 | 0.07 | 0.02 | 0 | 0.01 | 0.01 | | | | | | | |

Примечание. Серым фоном выделена частота встречаемости аллеля в популяции 20 или более процентов.

чаются гаплотипы, оставшиеся со времен заселения бассейна реки и участвовавшие в формировании новой популяции, а редкие гаплотипы – это результат накопления мутаций после того, как популяция была основана. Это свидетельствует об эффекте бутылочного горлышка – резком снижении численности предковой популяции сибирского осетра и последующем демографическом росте в условиях отсутствующего (или сильно ограниченного) потока генов. Данная гипотеза подтверждается тем фактом, что все выявленные массовые гаплотипы являются общими и встречаются в двух и более популяциях.

Исследование митохондриальной ДНК показало, что байкальская популяция сибирского осетра, единственная из всех проанализированных популяций, несет полный набор предковых мт-гаплотипов и, следовательно, с большой вероятностью является наиболее старой из всех пяти природных популяций. Можно предположить, что в один из периодов максимума оледенения Байкал был рефугиумом для сибирского осетра, который потом вновь распространился в основные сибирские реки через крупные послеледниковые озера, возникавшие в конце ледникового

Таблица 8. Значения генетических дистанций (F_{ST}) между исследованными природными популяциями сибирского осетра по данным микросателлитного анализа

| Популяции | Лена | Енисей | Байкал | Обь | Колыма |
|-----------|-------|--------|--------|-------|--------|
| Лена | | | | | |
| Енисей | 0.037 | | NS | | |
| Байкал | 0.043 | 0.012 | | | |
| Обь | 0.064 | 0.034 | 0.040 | | |
| Колыма | 0.048 | 0.032 | 0.030 | 0.043 | |

периода за счет подпруживания ледниковым щитом текущих на север сибирских рек [33]. Тогда же происходил и перелив этих озер в бассейн Аральского и Каспийского морей, что могло привести к обратному вселению этого вида в бассейн Каспия, гибридизации с каспийской популяцией русского осетра. Эта гипотеза объясняет происхождение так называемого “*baerii-like*” гаплотипа [34, 35], встречающегося в настоящее время у 30% особей русского осетра в каспийской популяции [18] и практически отсутствующего в Черном и Азовском морях [36].

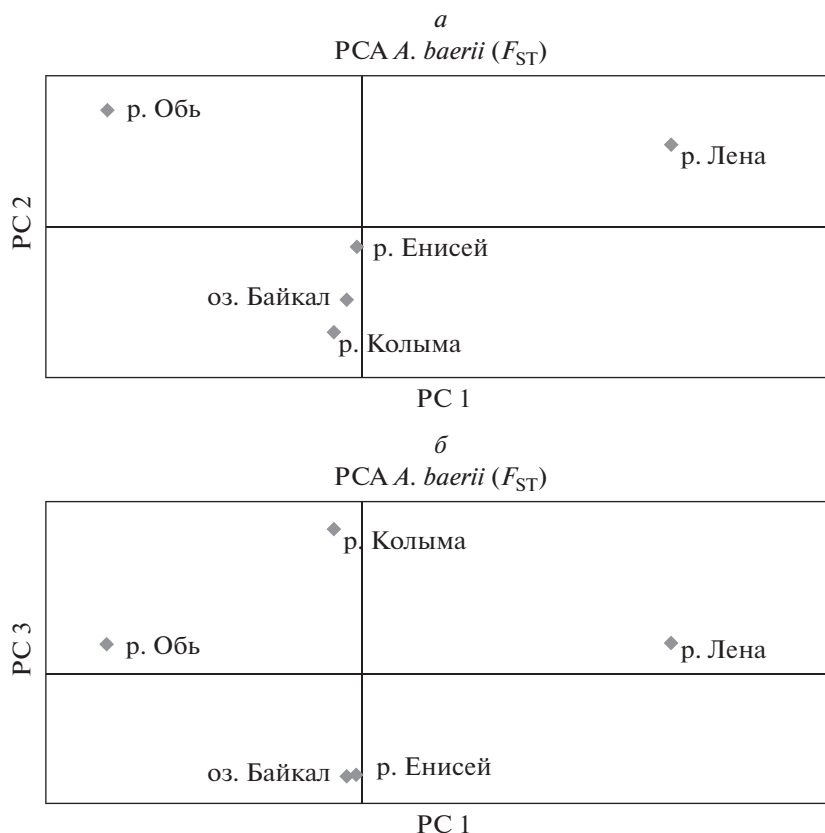


Рис. 3. Анализ главных компонент (PCA) исследованных выборок сибирского осетра по данным микросателлитного анализа по первой и второй (а) и первой и третьей (б) главным компонентам. Вклад 1-й, 2-й и 3-й главных компонент составляет 41.95, 26.83 и 24.2% соответственно.

Исследование генетического полиморфизма популяции р. Колыма, самой восточной из исследованных нами популяций, привело к несколько неожиданному выводу. Ранее представлялось, что заселение р. Колыма сибирским осетром наиболее вероятно происходило из бассейна р. Лена на основании морфологического сходства [37] и географической близости. Однако проведенный генетический анализ не выявил схожести колымской и ленской популяций ни по митохондриальным, ни по ядерным маркерам. Популяция Колымы имеет наиболее массовым гаплотип ВаеН36 (17 особей из 21), который встречается в оз. Байкал, но не в р. Лена. Анализ попарных расстояний (F_{ST}) по микросателлитным маркерам также не выявляет близости популяций Колымы и Лены, анализ главных компонент располагает самую восточную популяцию скорее с популяциями Байкала и Енисея, но не с соседним бассейном реки Лена. Эти данные свидетельствуют о независимом заселении бассейнов р. Лена и Колыма из общего рефугиума.

Несмотря на то что систематика сибирского осетра относит популяции оз. Байкал и р. Енисей к разным подвидам (байкальский и узкорылый осетры), нам не удалось выявить достоверных генетических различий между этой парой популяций. Это может объясняться существовавшим потоком генов, обусловленным возможностью до постройки Братской ГЭС миграции осетров из оз. Байкал вниз по р. Ангаре до р. Енисей.

В результате проведенного исследования выяснилось, что сибирский осетр представлен генетически хорошо различающимися группировками, соответствующими гидрографическим бассейнам, — Обь-Иртышская, Байкало-Енисейская, Ленская и Колымская. При получении и выпуске молоди сибирского осетра для искусственного воспроизводства необходимо учитывать популяционную принадлежность производителей. Несмотря на отсутствие выявленных генетических дистанций между байкальской и енисейской популяциями, эти формы имеют ярко выраженные различия в биологии и адаптированы к разным условиям обитания. Поэтому при искусственном воспроизводстве байкальской и енисейской популяций производители должны иметь локальное происхождение. Это позволит сохранить природное генетическое разнообразие и адаптивный потенциал локальных популяций.

Авторы благодарят Марину Чепуркину, Александру Панаиотиди, Сергея и Анну Давыдовых за любезно предоставленные генетические образцы осетров из рек Обь, Иртыш, Енисей, Колыма.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 15-29-02766 (сбор материала, анализ ядерной ДНК) и РНФ № 16-14-00221 (анализ полиморфизма мтДНК).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brandt J.F.* Einige Worte über die europaisch-asiatischen Storarten (Sturionides), von Johann Friedrich Brandt (Lu le 20 mai 1869) // *Bull. L'Academie Imperiale Sci. St.-Petersbourg*, 1870. V. 14. P. 171–175.
2. *Никольский А.М.* Гады и рыбы. Петроград: Брокгауз—Ефрон, 1902. 872 с.
3. *Sokolov L.I., Vasilev V.P.* *Acipenser baeri* Brandt, 1869 // *The Freshwater Fishes of Europe. General Introduction to Fishes, Acipenseriformes* / Ed. Holcick J. AULA: Verlag Wiesbaden, 1989. V. 1. Part. II. P. 262–284.
4. *Ruban G.I.* Species structure, contemporary distribution and status of the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* // *Env. Biol. Fish.* 1997. № 48. P. 221–230.
5. *Рубан Г.И.* О структуре вида сибирского осетра *Acipenser baerii* Brandt // *Вопросы ихтиологии.* 1998. Т. 38. № 3. С. 307–327.
6. *Рубан Г.И.* Сибирский осетр *Acipenser baerii* Brandt (структура вида и экология). М.: ГЕОС, 1999. 235 с.
7. *Birstein V.J., Desalle R., Doukakis F. et al.* Testing taxonomic boundaries and the limit of DNA barcoding in the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* // *Mitochondrial DNA.* 2009. V. 20(5–6). P. 110–118.
8. *Нефедов С.А., Демкина Н.В., Новикова Е.В., Нефедова И.В.* Формирование маточного стада сибирского осетра *Acipenser baerii* Brandt обской популяции в индустриальных условиях и оценка его генетической гетерозиготности // *Вопросы рыболовства.* 2008. Т. 9. № 3(35). С. 717–723.
9. Красная книга Российской Федерации (животные) // РАН; Гл. ред. кол.: Данилов-Данильян В.И. и др. М.: АСТ:Астрель, 2001. 862 с.
10. *Raymakers C.* CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora: its role in the conservation of Acipenseriformes // *J. Appl. Ichthyol.* 2006. V. 22. Suppl. 1. P. 53–65.
11. *Ludwig A.* Identification of Acipenseriformes species in trade // *J. Appl. Ichthyol.* 2008. V. 24. Suppl. 1. P. 2–19.
12. *Raymakers C., Hoover C.* Acipenseriformes: CITES implementation from Range States to consumer countries // *J. Appl. Ichthyol.* 2002. V. 18(4–6). P. 629–638.
13. IUCN Red List of threatened animals. International union for conservation of nature and natural resources // USA: Printed by Kelvyn Press, 1996. 368 p.
14. *Ruban G.I.* The Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt: Species structure and ecology // *Special Publication No. 1. Germany: Books on Demand, GmbH World Sturgeon Conservation Society*, 2005.
15. *Ivanova N.V., deWaard J., Hebert P.D.N.* An inexpensive, automation friendly protocol for recovering high quality DNA // *Mol. Ecol. Notes.* 2006. V. 6. P. 998–1002.
16. *Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Распоргуев С.М. и др.* Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // *Генетика.* 2008. Т. 44. № 7. С. 913–919.
17. *Clement M., Posada D., Crandall K.* TCS: a computer program to estimate gene genealogies // *Mol. Ecol.* 2000. № 9(10) P. 1657–1660.
18. *Excoffier L., Lischer H.E.* Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics anal-

- yses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Res.* 2010. № 10. P. 564–567.
19. Rozas J. DNA Sequence polymorphism analysis using DNAsp // *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology* / Ed. Posada D. N.Y., USA: Humana Press, 2009. V. 537. P. 337–350.
 20. Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // *Mol. Ecol. Notes.* 2002. V. 2. P. 586–588.
 21. Welsh A.B., Blumberg M., May B. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* // *Mol. Ecol. Notes.* 2003. V. 3. P. 47–55.
 22. Henderson-Arzapalo A., King T.L. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management // *Mol. Ecol. Notes.* 2002. V. 2. P. 437–439.
 23. Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (Acipenseridae) и выявления особей гибридного происхождения // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 9. С. 1093–1105.
 24. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* 2000. V. 155. P. 945–959.
 25. Clark L.V., Jasieniuk M. POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis // *Mol. Ecol. Res.* 2011. V. 11(3). P. 562–566.
 26. Hardy O.J., Vekemans X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels // *Mol. Ecol. Notes.* 2002. V. 2. P. 618–620.
 27. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes.* 2006. V. 6. P. 288–295.
 28. Bemis W.E., Findeis E.K., Grande L. An overview of Acipenseriformes // *Env. Biol. Fish.* 1997. V. 48. P. 25–71.
 29. Fontana F., Tagliavini J., Congiu C. Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives // *Genetica.* 2001. V. 111. P. 359–373.
 30. Birstein V.J., Hanner R., DeSalle R. Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches // *Sturgeon Biodiversity and Conservation.* Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 127–155.
 31. Birstein V.J., DeSalle R. Molecular phylogeny of Acipenserinae // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1998. V. 9. P. 141–155.
 32. Peng Z., Ludwig A., Wang D. et al. Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes) // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007. V. 42. P. 854–862.
 33. Mangerud J., Jakobsson M., Alexanderson H. et al. Ice-dammed lakes and rerouting of the drainage of northern Eurasia during the Last Glaciation // *Quat. Sci. Rev.* 2004. V. 23. P. 1313–1332.
 34. Birstein V.J., Doukakis P., DeSalle R. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: Forensic and evolutionary implications // *Conserv. Genet.* 2000. V. 1. № 1. P. 81–88.
 35. Jenneckens I., Meyer J.-N., Debus L. et al. Evidence of mitochondrial DNA clones of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, caught in the River Volga // *Ecol. Lett.* 2000. V. 3. № 6. P. 503–508.
 36. Тимошкина Н.Н., Барминцева А.Е., Усатов А.В., Мюге Н.С. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) // *Генетика.* 2009. Т. 45. № 9. С. 1250–1259.
 37. Рубан Г.И., Акимова Н.В. Особенности экологии сибирского осетра *Acipenser baerii* реки Кольмы // *Вопросы ихтиологии.* 1993. Т. 33. № 1. С. 84–92.

Natural Genetic Polymorphism and Phylogeography of Siberian Sturgeon *Acipenser baerii* Brandt, 1869

A. E. Barmintseva^{a,b,*} and N. S. Muge^{a,b,**}

^aRussian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 107140 Russia

^bKoltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: bae69@mail.ru,

**e-mail: muge@mail.ru

Five populations of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* collected throughout the species distribution range (Lake Baikal, Lena, Yenisei, Kolyma, and Irtysh Rivers) were examined for genetic polymorphism using five tetraploid microsatellite loci and the mitochondrial DNA control region. It was demonstrated that Siberian sturgeon was represented by genetically well-differentiated groups that corresponded to hydrographic basins, Ob–Irtysh, Baikal–Yenisei, Lena, and Kolyma. Population assignment of the Siberian sturgeon broodstock should be considered in the restocking programs. English translation of the paper published in Russian Journal of Genetics, 2017, Vol. 53, No. 3, is available ONLINE by subscription from: <http://www.springer.com/>, <http://link.springer.com/journal/11177>.

Keywords: mitochondrial DNA, mt-haplotype, control region, microsatellite analysis, genetic polymorphism.