

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ПОБЕДИНЦЕВА МАРИЯ АЛЕКСЕЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РЕЧНЫХ
И ОЗЕРНЫХ ПОЛИПЛОИДНЫХ РЫБ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ**

03.01.07 - Молекулярная генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Трифонов Владимир Александрович

Новосибирск – 2022

Оглавление	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность темы исследования	6
Степень разработанности проблемы	7
Цели и задачи исследования	7
Научная новизна	8
Теоретическая и научно-практическая значимость работы	9
Положения, выносимые на защиту	9
Степень достоверности и апробация результатов	10
Публикации	10
Вклад автора	13
Структура и объем диссертации	13
Благодарности	13
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Общая характеристика осетровых	14
1.1.1. Особенности строения геномов осетровых	15
1.1.2. Распространение и видовые характеристики стерляди (<i>Acipenser ruthenus</i>)	17
1.1.3. Распространение и видовые характеристики сибирского осетра (<i>Acipenser baerii</i>)	18
1.2. Распространение и видовые характеристики серебряного карася (<i>Carassius gibelio</i>)	19
1.3. События демографической истории популяций	20
1.4. Особенности изучения молекулярно-генетических характеристик полиплоидных организмов	21
1.5. Современное состояние популяционных исследований полиплоидных речных рыб	23
1.6. Методы филогенетического анализа, применяемые в популяционных исследованиях	26
1.6.1. Основные способы выравнивания последовательностей	26
1.6.2. Алгоритмы выравнивания	27
1.6.3. Методы филогенетической реконструкции	29
1.6.4. Модели семейства GTR	30

1.6.5. Дистанционные методы	32
1.6.6. Методы филогенетической реконструкции	33
1.6.7. Методы проверки статистической достоверности	34
1.6.8. Популяционный анализ	34
1.7. Исследование субфоссильных проб промысловых видов	35
1.8. Заключение по обзору литературы	36
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Материалы, использованные в работе	38
2.2. Методы	38
2.2.1. Выделение ДНК из сухих плавников и плавников в спирте рыб	38
2.2.2. Амплификация контрольного района мтДНК	38
2.2.3. Электрофорез в агарозном геле	39
2.2.4. Очистка ПЦР-продуктов	39
2.2.5. Секвенирование по методу Сэнгера	39
2.2.6. Приготовление библиотек мтДНК под индексами Illumina	40
2.2.7. Обогащение библиотек	40
2.2.7.1. Получение матрицы для обогащения	40
2.2.7.2. Биотинилирование в реакции ник-трансляции	41
2.2.7.3. Гибридизация	41
2.2.7.4. Очистка продуктов гибридизации	42
2.2.8. Выделение ДНК и амплификация ДНК субфоссильных проб	42
2.2.9. Методы филогенетического анализа	43
2.2.9.1. Для контрольного района мтДНК	43
2.2.9.2. Для полных митохондриальных геномов	44
2.2.10. Методы популяционного анализа	45
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	47
3.1. Структура популяции стерляди в реках северной Евразии	47
3.1.1. Филогения гаплотипов современной стерляди в реках Сибири	47
3.1.2. Филогеография гаплотипов стерляди	51
3.1.3. Исследование субфоссильных проб стерляди и их сравнение с современной популяцией	54

3.1.3.1. Исключение гипервариабельных позиций и анализ сайтов дезаминирования	54
3.1.3.2. Филогения гаплотипов субфосильных проб стерляди	55
3.1.4. Демографическая история популяции и оценка молекулярных часов	58
3.2. Структура популяции сибирского осетра в реках северной Евразии	62
3.2.1. Филогения гаплотипов сибирского осетра	62
3.2.2. Филогеография гаплотипов сибирского осетра	65
3.2.3. Демографическая история популяции и оценка молекулярных часов	67
3.3. Анализ полных митохондриальных геномов представителей основных гаплогрупп стерляди и сибирского осетра	70
3.4. Структура популяции серебряного карася в реках северной Евразии	71
3.4.1. Филогения гаплотипов серебряного карася	71
3.5.1. Филогеография гаплотипов серебряного карася	74
4. ОБСУЖДЕНИЕ	77
4.1. Молекулярно-генетическое разнообразие стерляди и сибирского осетра	77
4.2. Молекулярно-генетическое разнообразие серебряного карася	81
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
6. ВЫВОДЫ	85
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	86
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	97
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	99
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	102
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	103
ПРИЛОЖЕНИЕ 5	108
ПРИЛОЖЕНИЕ 6	110
ПРИЛОЖЕНИЕ 7	111
ПРИЛОЖЕНИЕ 8	113
ПРИЛОЖЕНИЕ 9	115
ПРИЛОЖЕНИЕ 10	118

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

мт - митохондриальный

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК - рибонуклеиновая кислота

мтДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

Ac1R – первый раунд полногеномной дупликации специфичной для осетровых

Ac2R – второй раунд полногеномной дупликации специфичной для осетровых

SNP – (Single-Nucleotide Polymorphism) однонуклеотидная замена

ПЦР – полимеразная цепная реакция

4дНТФ – 4-дезоксинуклеотидтрифосфаты

дАТФ – дезоксиаденозинтрифосфат

дГТФ – дезоксигуанозинтрифосфат

дСТФ – дезоксицитидинтрифосфат

дТТФ – дезокситимидинтрифосфат

SSC – (Standart Saline Citrate solution) – стандартный солевой цитратный буфер

ТАЕ – (Tris-Acetate Buffer) - трис-ацетатный буфер

MAFFT – Multiple Alignment using Fast Fourier Transform

AMOVA – (Analysis of molecular variance) анализ молекулярного разнообразия

пн – пары нуклеотидов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Численность многих ценных промысловых видов рыб снижается в результате хозяйственной деятельности человека, браконьерства, ухудшения экологических условий [1]. 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 [2].

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 [3]. Поэтому более удобным методом работы с полиплоидными видами является изучение митохондриальных 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 [4]. К современному семейству осетровых относится 25 видов, они все занесены в различные категории Международной красной книги, многие виды находятся на грани исчезновения [5], 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 [6]. Осетровые занимают базальное положение среди лучеперых рыб и представляют собой идеальную эволюционную группу для исследования сложной взаимосвязи между фенотипами и полиплоидными геномами [7].

В последние годы активно развивается аквакультура таких видов осетровых как стерлядь (*Acipenser ruthenus*) и сибирский осетр (*Acipenser 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.

Степень разработанности проблемы

В настоящее время популяции стерляди западных рек Евразии (Дунай, Днестр, Волга) изучены с использованием генетических маркеров лучше, чем восточные популяции [8–10]. Согласно некоторым исследованиям популяции данного вида Дуная, Волги и Оби сильно различаются [10]. В Обь-Иртышском бассейне в течение многих лет изучались морфологические характеристики осетровых, и на основании различия морфологических форм, были выделены подвиды как стерляди, так и сибирского осетра [11,12]. Исследования природных популяций с применением генетических маркеров в реках Сибири проводились только на популяциях сибирского осетра [13], и не подтвердили гипотезу о выделении подвидов сибирского осетра. Исследования стерляди и сибирского осетра из рыбоводных хозяйств показали сниженное генетическое разнообразие данных видов в аквакультуре в сравнении с природными популяциями [14,15].

Серебряный карась существует на всем ареале в трех формах – диплоидной, партеногенетической триплоидной и тетраплоидной. В западной и восточной части ареала описаны молекулярно-генетические характеристики этих форм, а также характер филогенетических взаимоотношений между митохондриальными гаплотипами. Популяции данного вида Западной Сибири остаются не охарактеризованными с точки зрения гаплотипического разнообразия.

Цели и задачи исследования

Основная цель настоящей работы – 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 дерева.

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.

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 [16].

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.

Положения, выносимые на защиту

1. 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.
2. 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.
3. Среди ископаемых образцов стерляди в бассейне Волги доминируют гаплогруппы С, Е и F, и отсутствуют гаплогруппы А, D, I, J, К и L, преобладающие в восточной части ареала.
4. 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.
5. 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.

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 на список литературы, процитированной в диссертации.

Материалы диссертационной работы были представлены на конференциях:

1. V научно-практическая конференция молодых ученых с международным участием «Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса», Москва, 17-18 апреля 2017 г.
2. II Всероссийская конференция с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике», Новосибирск, 18-23 июня 2017 г.
3. XXV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 9-13 апреля 2018 г.
4. Международная конференция «Хромосома 2018», Новосибирск, 20-24 августа 2018 г.
5. 3rd International Conference «SmartBio», Каунас, Литва, 2-4 мая 2019 г.

Публикации

По результатам работы опубликовано 3 статьи:

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 DNA Mapp Seq Anal.* 2019 Jan;30(1):156-164. doi: 10.1080/24701394.2018.1467409. Epub 2018 May 2. PMID: 29716429.
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 doi: 10.31857/S0016675821040111.

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. In Press.

14 тезисов:

1. Трифонов В.А., Романенко С.А., **Побединцева М.А.**, Кулемзина А.И., Воробьева Н.В., Сердюкова Н.А., Интересова Е.А., Корентович М.А., Зайцев В.Ф., Беклемишева В.Р., Билтуева Л.С., Гладких О.Л., Лемская Н.А., Макунин А.И., Кудрявцева А.В., Комиссаров А.С., Кливер С., Графодатский А.С. Эволюционная геномика осетровых (Acipenseridae). Материалы международной конференции «Хромосома 2015», 24-28 августа 2015 г, Новосибирск, стр. 162.
2. **Побединцева М.А.**, Кулемзина А.И., Воробьева Н.В., Сердюкова Н.А., Интересова Е.А., Корентович М.А., Зайцев В.Ф., Романенко С.А., Макунин А.И., Щербаков Д.Ю., Графодатский А.С., Трифонов В.А. Генетическая структура популяции стерляди (*Acipenser ruthenus*) в бассейне реки Обь. Материалы международной конференции «Хромосома 2015», 24-28 августа 2015 г., Новосибирск стр. 139.
3. В.А. Трифонов, С.А. Романенко, **М.А. Побединцева**, А.И. Кулемзина, Н.В. Воробьева, Н.А. Сердюкова, Е.А. Интересова, М.А. Корентович, В.Ф. Зайцев, В.Р. Беклемишева, Л.С. Билтуева, Д.В. Прокопов, О.Л. Гладких, Н.А. Лемская, А.И. Макунин, А.В. Кудрявцева, А.С. Комиссаров, С.Ф. Кливер, А.С. Графодатский. Сравнительная геномика осетровых: эволюционный и прикладной аспекты. Международная конференция «Водные экосистемы Сибири и перспективы их использования», 22-24 ноября 2016 г., Томск.
4. **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, Д.Ю. Щербаков, А.С. Графодатский, В.А. Трифонов. Генетическое разнообразие осетровых (Acipenseridae) в Обь-Иртышском бассейне. Международная конференция «Водные экосистемы Сибири и перспективы их использования», 22-24 ноября 2016 г., Томск.
5. Решетникова С.Н., Трифонов В.А., Сердюкова Н.А., Кичигин И.Г., **Побединцева М.А.**, Мишакин А.В., Интересова Е.А. Генетическое разнообразие серебряного карася *Carassius auratus* (Cyprinidae) в бассейне Средней Оби. Международная конференция

«Водные экосистемы Сибири и перспективы их использования», 22-24 ноября 2016 г., Томск.

6. **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.
7. Трифонов В.А., Макунин А.И., Романенко С.А., Беклемишева В.Р., Билтуева Л.С., Прокопов Д.Ю., **Побединцева М.А.**, Дружкова А.С., Андреюшкова Д.А., Гусельников С.В., Сердюкова Н.А., Кудрявцева А.В., Комиссаров А.С., Кливер С.Ф., Шартл М., Графодатский А.С. Секвенирование и анализ генома и транскриптома стерляди (*Acipenser ruthenus*). Acta Naturae 2017 Спецвыпуск №1 Т. 9 С. 80.
8. V.A. Trifonov, A.I. Makunin, S.A. Romanenko, L.S. Biltueva, V.R. Beklemisheva, **М.А. Pobedintseva**, D.Yu. Prokopov, D. A. Andreyushkova, A.S. Graphodatsky. Whole Genome Duplications in Vertebrate Evolution. Meeting abstracts from the 11th European Cytogenetics Conference (Florence, Italy, July 1-4, 2017). Molecular Cytogenetics 2017, 10(Suppl 1):20 P.4.
9. **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. V научно-практическая конференция молодых ученых с международным участием «Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса», Москва, 17-18 апреля 2017 г.
10. **Побединцева М.А.** Генетическое разнообразие древней и современной стерляди (*Acipenser ruthenus*) в бассейне Волги. XXV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 9-13 апреля 2018 г.
11. **Побединцева М.А.** Популяционная генетика осетровых Сибири. Международная конференция «Хромосома 2018», Новосибирск, 20-24 августа 2018 г.
12. Vladimir A. Trifonov, Daria A. Andreyushkova, Svetlana A. Romanenko, **Maria A. Pobedintseva**, Dmitry Yu. Prokopov, Larisa S. Biltueva, Violetta R. Beklemisheva, Anna S. Druzhkova, Alexey I. Makunin, Alexander S. Graphodatsky. Polyploidy and genome

evolution of ray-finned fishes. Материалы международной конференции «Хромосома 2018», 20-24 августа 2018 г, Новосибирск стр. 81.

13. **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 ISSN 2669-0381.

Вклад автора

Автором полностью выполнена экспериментальная работа по гаплотипированию коллекций субфоссильных и современных образцов. Подготовлены библиотеки 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

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 РФФ 14-14-00275, 18-44-04007.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика осетровых

Семейство осетровых (Acipenseridae) относится к классу костных рыб (Osteichthyes), подклассу лучеперых (Actinopterygii) и входит в надотряд хрящевых ганоидов (Chondrostei), наиболее ранние формы которых относятся к Юрскому периоду. Предполагают, что хрящевые ганоиды – это группа, сформировавшаяся в пресноводных бассейнах северного полушария в раннем Триасовом периоде от древних предков, принадлежащих к палеонискообразным [4]. Современное семейство осетровых включает 25 видов. К подсемейству Acipenserinae относится 19 видов, населяющих озера, реки и побережья северного полушария. На территории России обитает 11 видов – стерлядь (*Acipenser ruthenus*), сибирский осетр (*A. baerii*), русский осетр (*A. gueldenstaedtii*), севрюга (*A. stellatus*), белуга (*Huso huso*), калуга (*H. dauricus*), амурский осетр (*A. schrenckii*), сахалинский осетр (*A. mikadoi*), шип (*A. nudiiventris*), персидский осетр (*A. persicus*) и атлантический осетр (*A. sturio*). Четыре вида обитает в Америке – озерный осетр (*A. fulvescens*), зеленый осетр (*A. medirostris*), тупорылый осетр (*A. brevirostrum*) и белый осетр (*A. transmontanus*). Один вид обитает у берегов Японии – японский осетр (*A. multiscutatus*), два вида в реке Янцзы – китайский осетр (*A. sinensis*) и корейский осетр (*A. dabryanus*), и один вид заходит в реки южной Европы – адриатический осетр (*A. naccarii*) (Рис.1).

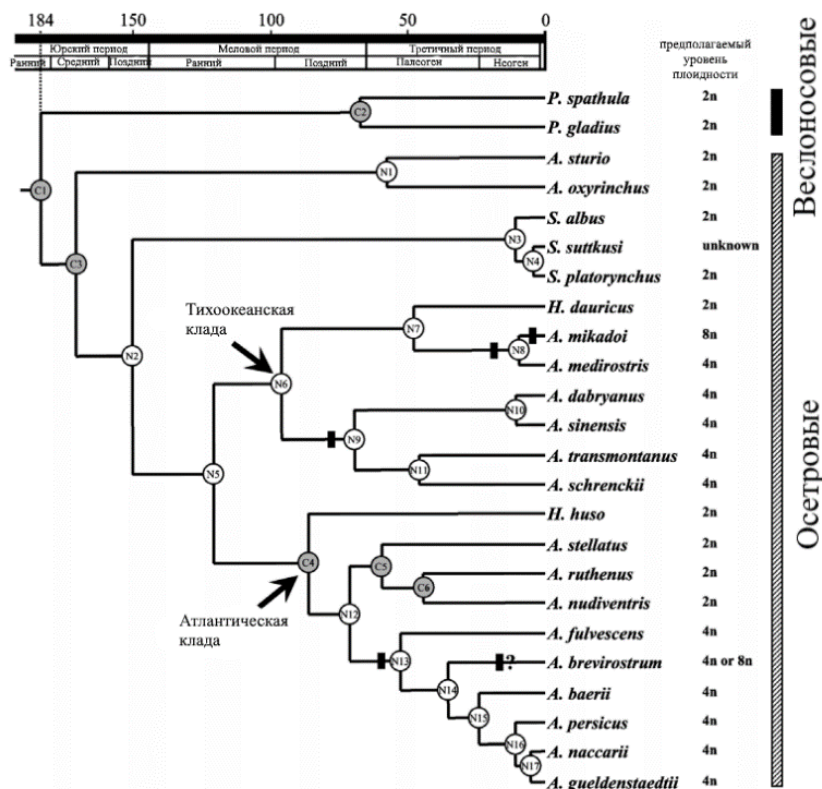


Рисунок 1. Филогенетическое древо отряда осетрообразных (Acipenseriformes), построенное на основании последовательности цитохрома b по статье Пенга (модифицированное) [17].

Некоторые виды осетровых мигрируют на нерест из морей в реки, такие виды называются проходными [18], а есть виды, относительно оседлые, совершающие миграции только в пределах рек [19] – резидентные. Отличительными чертами семейства осетровых являются долгожительство (у разных видов продолжительность жизни варьирует от 26 до 60 лет), позднее половое созревание (на 4 – 23 году жизни, в зависимости от вида [6]), не ежегодный нерест.

1.1.1. Особенности строения геномов осетровых

Семейство осетровых вызывает значительный интерес исследователей с точки зрения эволюции геномов. Осетровые занимают одно из базальных положений среди лучеперых рыб. Несмотря на обилие работ по систематике этого класса, обстоятельства происхождения клад костных рыб, а также их взаимосвязь, в значительной степени остаются неразрешенными [20]. Изучение геномов осетровых является очень значимым для исследования происхождения позвоночных.

На основании цитогенетических и молекулярно-генетических данных, а также по оценкам размера геномов было выдвинуто предположение, что первый раунд

специфичной для осетрообразных полногеномной дупликации независимо произошел как у предков осетровых (Ac1R), так и у веслоносых (Po1R) [21,22]. Среди осетровых произошло несколько дополнительных событий полной дупликации генома, в результате которых появились ≈ 250 -хромосомные и ≈ 370 -хромосомные виды (Ac2R) [23]. Однако в большинстве случаев остается неясным, является ли это событиями ауто- или аллополиплоидизации. Эти процессы продолжают до сих пор у разных видов осетровых [24].

К необычным кариологическим характеристикам этой древней группы позвоночных относится наличие точечных микрохромосом, которые, как впервые предположил Оно с соавторами [25], представляют предковое состояние и объединяют их с другими базальными лучеперыми рыбами, латимериями, двоякодышащими, рептилиями и птицами. Позже было показано, что большинство хромосом, ранее идентифицированных как «точечные» микрохромосомы, морфологически можно отнести к мета/субметацентрическим или акроцентрическим [26].

Другой кариологической особенностью этой группы является отсутствие строго фиксированного числа хромосом, которое варьирует от 99 до 120 для видов с событием полной дупликацией генома Ac1R и от 239 до 270 хромосом для видов с Ac2R полногеномной дупликацией [23]. Существует значительная вариация внутри каждого вида, а также внутрииндивидуальные вариации, которые усложняют идентификацию точного модального числа хромосом [27,28].

Полиплоидизация дала новый генетический материал для создания фенотипического разнообразия среди осетровых [7]. Однако это семейство имеет довольно ограниченное видовое разнообразие при достаточно быстрых темпах эволюции размера тела, что является интересным исключением из гипотезы о том, что фенотипическая «эволюционность» — способность организмов эволюционировать — формирует динамику видообразования во времени в самых больших филогенетических масштабах. Как одна из самых ранних эволюционировавших групп среди лучеперых рыб, осетровые до сих пор сохраняют многие черты древних рыб, такие как хрящевой скелет и гетероцеркальный хвост, а современные виды выглядят заметно похожими на своих ископаемых предков [29]. Осетровые представляют собой удобный модельный таксон для исследования сложной взаимосвязи между фенотипами и полиплоидными геномами [7].

Определение пола у осетровых (Acipenseridae) долгое время было неразрешенной биологической проблемой, связанной с экономическими потребностями аквакультуры, ориентированной на производство икры. В недавнем исследовании была обнаружена специфическая для самок область генома, соответствующая потенциальной системе определения пола ZZ/ZW у стерляди [30]. Этот вывод согласуется с предыдущими предположениями или косвенными свидетельствами того, что осетровые обладают гетерогаметной системой определения пола самок [31,32]. Этот геномный регион и его специфичность у самок сохраняется как минимум у шести видов осетровых, охватывающих все филогенетическое дерево. В геноме стерляди последовательность находится на хромосоме 4 [30]. Следует отметить, что эта геномная область также сцеплена с полом у двух октоплоидных видов – русского осетра (*A. gueldenstaedtii*) и сибирского осетра (*A. baerii*). Требуется дополнительное исследование по эволюции этого региона у остальных представителей семейства осетровых, чтобы оценить сохраняется ли этот древний специфичный для самок геномный регион также у других видов. Возможно, этот регион может быть частью более крупного полового локуса. Главный ген(ы), определяющий пол, или другие регуляторные элементы, отвечающие за этот процесс, все еще остаются неизвестными. Эти данные указывают на самую старую из известных систем определения пола позвоночных с недифференцированными половыми хромосомами. Сохранение последовательности, специфичной для самок, на протяжении 180 млн лет эволюции осетровых и, по крайней мере, в течение одного дополнительного события полиплоидизации поднимает множество интересных биологических и эволюционных вопросов [30].

1.1.2. Распространение и видовые характеристики стерляди (*Acipenser ruthenus*)

Стерлядь (*A. ruthenus*) – один из небольших по размеру видов осетровых, широко распространенный на Евразийском континенте, в реках от Дуная до Енисея [33]. Занесен в Красную книгу как вид, находящийся под угрозой исчезновения.

Стерлядь является самым мелким представителем рода. Длина тела достигает до 1 м, вес до 6–6,5 кг. Предельная продолжительность жизни составляет 26–27 лет. Половозрелыми становятся рано – 4–5 лет для самцов и 5–7 лет для самок. Было отмечено, что стерлядь, населяющая европейские реки, становится половозрелой на 1-2 года раньше стерляди в сибирских реках [6].

Несмотря на то, что стерлядь обитает исключительно в пресноводных водоемах, существуют разные мнения о совершении стерлядью миграций. В некоторых исследованиях показано, что стерлядь – относительно оседлый вид, совершающий миграции на 200-300 км по рекам [34], но последние исследования популяций Волги с использованием морфологических, физиологических характеристик и паразитарных инфекций показали полупроходной характер, то есть среди популяций стерляди могут встречаться те, что обитают в прибрежьях морей и совершает миграции на нерест в верховья рек [35]. Также ранее некоторые исследователи выделяли европейскую и сибирскую популяции стерляди, основываясь на морфологических и физиологических описаниях [4], но более поздние популяционно-генетические исследования это не подтвердили [36].

В кариотипе стерляди 120 хромосом. В 2020 году для стерляди впервые была собрана последовательность генома до уровня хромосом [37]. Было обнаружено, что геном этого вида является результатом древнего события полной дупликации генома, который оставался близким к тетраплоидному из-за низкой скорости эволюции. При этом эволюцию кариотипа сопровождали множественные перестройки, особенно с участием хромосом среднего размера [38,39]. Таким образом, геном стерляди служит хорошим примером предкового генома лучеперых рыб [37].

1.1.3. Распространение и видовые характеристики сибирского осетра (*Acipenser baerii*)

Сибирский осетр (*A. baerii*) – второй вид осетровых, рассматриваемый в данной работе. Его ареал простирается от Обь-Иртышского бассейна до реки Колымы, а также в озере Байкал, вид является проходным [11]. Занесен в Красную книгу как вид, находящийся под угрозой исчезновения.

Размер особей сибирского осетра может достигать до 2 м в длину, вес до 60–65 кг. Поздно становятся половозрелыми, самцы не ранее 7 лет, самки не ранее 9 лет (в зависимости от бассейна). При этом известно о высоком темпе роста и более раннем созревании этих видов в искусственных условиях [6].

Для сибирского осетра были описаны формы с различающимися морфологическими особенностями особей в разных областях ареала [40–42], из-за чего существует множество литературных данных о выделении подвидов этого вида. Описывают такие подвиды как *A. b. baeri* – в Обь-Иртышском бассейне, *A. b.*

stenorhynchus – узкорылый осетр, в реках Енисей и Лена, *A. b. baikalensis* – байкальская форма сибирского осетра – в озере Байкал и впадающих в него реках [33]. Однако более поздние исследования популяций разных рек с использованием молекулярно-генетических маркеров не подтвердили существование подвидов сибирского осетра [43].

Сибирский осетр относится к 250-хромосомной группе осетров, прошедших дополнительный раунд удвоения генома [23]. В настоящий момент геном этого вида не прочитан полностью.

Поскольку кариотипы 250-хромосомных видов сложно охарактеризовать цитогенетически, применение молекулярных маркеров позволяет провести первоначальную стандартизацию кариотипов осетровых. К настоящему моменту построена подробная хромосомная карта сибирского осетра и показаны сложные перестройки генома после Ac2R. К ним относились изменения хромосомной структуры кариотипа, слияния и деления хромосом, экспансии и редукции tandemных повторов, а также эволюционная динамика кластеров рибосомной ДНК [44].

1.2. Распространение и видовые характеристики серебряного карася (*Carassius gibelio*)

Серебряный карась (*C. gibelio*) является представителем семейства карповых (Cyprinidae) имеет протяженный ареал в Евразии и Америке. Некоторые авторы полагают, что такие границы ареала были достигнуты путем искусственного расселения данного вида, а его местом естественного обитания является река Амур с прилегающими водоемами [45].

Размер особей обычно до 50 см и вес до 2 кг. Половозрелым становится на 2–4 год. Средняя продолжительность жизни 7-10 лет [6]. Серебряный карась представлен формами с разным уровнем ploидности – диплоидной ($2n=100$), триплоидной ($3n=150$) и тетраплоидной ($4n=200$), при этом морфологически эти формы трудно различимы [46,47]. Для диплоидных форм характерно классическое гонохорическое размножение, и в таких популяциях соотношение полов практически равное. Популяции с триплоидными формами представлены как правило гиногенетическими самками.

Было показано, что у серебряного карася помимо увеличения числа хромосом за счет двух циклов относительно недавней полиплоидизации [48], кариотип содержит переменные микрохромосомы в разных гиногенетических линиях [49,50].

Караси легко натурализуются в местах интродукции и нередко замещают аборигенные формы [51]. В Европе *Carassius gibelio* является инвазивным видом [52,53]. В водоемах Западной Сибири караси известны с XVIII века и широко распространены [54]. В конце 70-х годов XX века, в ходе работ по повышению биопродукционного потенциала водоемов, широко проводившихся на территории Сибири в течение всего столетия [55], в оз. Убинское (Обь-Иртышское междуречье, бассейн замкнутого стока) были вселены серебряные караси из р. Амур, с предположительно большим темпом роста. В первой половине 90-х годов вселенец проник в оз. Чаны, где, как предполагается, полностью вытеснил аборигенную форму [56]. Подобное замещение наблюдается и в иных озерах региона [57]. Однако вопрос о возможном проникновении амурской формы серебряного карася в р. Обь до настоящего времени оставался открытым.

В бассейне Волги также было показано, что серебряный карась для территории Среднего Поволжья не является аборигенным видом, и впервые стал отмечаться в середине – конце XIX в., до середины восьмидесятых годов XX в. имел мозаичное распространение и низкую численность. Но на сегодняшний день распространен повсеместно, имеет значительную долю в населении рыб как речных экосистем, так и в водоемах озерного типа [58].

Эффект вселения новых видов часто является труднопредсказуемым, так как в процессе натурализации чужеродного вида он всегда оказывает влияние на реципиентную экосистему. Поэтому необходим тщательный мониторинг инвазионного процесса.

1.3. События демографической истории популяций

Демографическую историю видов описывают различные эволюционные события, они могут показать внезапный рост или падение численности популяции. Одно из таких событий эффект «бутылочного горлышка» - процесс, при котором происходит снижение генетического разнообразия популяции под воздействием внешних факторов – климатических и экологических изменениях, антропогенном влиянии. Генетическое разнообразие снижается из-за резкого уменьшения численности популяции. В дальнейшем численность популяции восстанавливается, но изменяются относительные и абсолютные частоты аллелей, вследствие обедненного генофонда. Генетическое

разнообразии остается низким, увеличиваясь только тогда, когда происходит приток генов из других популяций, или очень медленно со временем, когда происходят случайные мутации. В результате этого снижается устойчивость популяции, но может происходить развитие новых адаптаций, такие как приспособление к новым условиям климата или изменение доступных ресурсов [59].

Другое событие, приводящее к снижению или смещению генетического разнообразия – это «эффект основателя» [60]. Этот процесс происходит при заселении новой географической территории небольшим количеством представителей вида. В результате утраты генетической изменчивости новая популяция может отчетливо отличаться как генетически, так и фенотипически от родительской популяции, из которой она произошла. Считается, что в крайних случаях эффект основателя приводит к видообразованию и последующей эволюции новых видов [61]. Новая популяция с невысокой численностью может иметь повышенную чувствительность к дрейфу генов, увеличение инбридинга (близкородственного скрещивания) и относительно низкую генетическую изменчивость.

Генетический дрейф – это изменение частот аллелей в популяции в ряду поколений под действием стохастических факторов. То, насколько интенсивно будут идти такие изменения, зависит непосредственно от эффективного размера популяции – то есть от количества особей, участвующих в размножении. В больших популяциях поддерживается постоянство аллельных частот в ряду поколений, а в малых это свойство утрачивается и увеличивается вероятность случайных флуктуаций. Под действием дрейфа генов нарастают различия между изолированными друг от друга популяциями с низкой численностью. Одновременно с этим внутри популяций увеличивается частота инбридинга, что ведет к снижению генетического разнообразия [62].

Изучение таких событий в популяциях позволяет предполагать, как развивалась история вида или конкретной популяции и насколько стабильна популяция в настоящий момент.

1.4. Особенности изучения молекулярно-генетических характеристик полиплоидных организмов

В ходе своей эволюции многие таксоны растений и животных прошли один или несколько раундов дупликации генома [63]. Эволюционный путь вида зависит от

процессов, влияющих на распределение генетической изменчивости внутри вида – от генетического дрейфа, способов размножения и наследования, моделей сегрегации, миграций, скоростей мутации и отбора. У полиплоидных организмов эти процессы могут работать иначе, чем у диплоидных, что приводит к другим закономерностям в распределении генетической изменчивости. Поэтому, в процессе анализа паттернов эволюционных процессов у полиплоидов, результаты необходимо интерпретировать иначе, чем для диплоидов.

Данные по характеристикам популяций полиплоидных организмов восходят еще к работам Холдейна [64], но всесторонний обзор теоретической популяционной генетики полиплоидов отсутствует до сих пор, несмотря на обширную представленность таких методов для диплоидных организмов [65,66].

Помимо теоретических аспектов, существуют и практические проблемы, усложняющие анализ популяций полиплоидов [67]: инструменты и теории, разработанные для диплоидов, не всегда подходят для полиплоидов; в работе таких методов, результаты могут быть необъективными, а интерпретация результатов должна учитывать особенности полиплоидных геномов.

Практической проблемой, характерной для генетического анализа полиплоидных видов, является невозможность различить аллельные варианты. В работе Дюфресна [67] был представлен подробный обзор этих и других проблем популяционной генетики полиплоидов, способов их решения и доступных статистических инструментов.

Полиплоидная популяция может содержать большее генетическое разнообразие, чем диплоидная популяция такого же размера. Это связано с тем, в полиплоидной популяции общее число копий хромосом больше, чем в диплоидной популяции. Тетраплоидная популяция размером N имеет в общей сложности $4N$ копий хромосом в аутосомном локусе, тогда как диплоиды имеют $2N$ копий. Следовательно, при одинаковой частоте мутаций, их количество на поколение вдвое больше в тетраплоидной популяции. Для маркеров с низкой частотой мутаций уровень разнообразия в тетраплоидной популяции может быть до двух раз выше, чем в аналогичной популяции диплоидов. Для маркеров с высокой частотой мутаций диплоиды будут лишь немного менее разнообразны, чем тетраплоиды. Наряду с увеличением числа мутаций, большее число копий хромосом также влияет на силу генетического дрейфа, который снижается в популяции полиплоидов [3].

Набор статистических инструментов, доступных для работы с полиплоидными организмами постоянно расширяется и дополняется. Современные методы секвенирования могут обойти некоторые ограничения, например, когда глубина прочтений достаточно высока, проблема потери дозы гена может быть решена [3].

Новые методы также приносят новые проблемы – многие геномные инструменты для сборки, подсчета и проверки качества данных секвенирования разработаны для диплоидов, и их адаптация для использования с полиплоидами может оказаться непростой задачей. Добавление дополнительных локусов может приводить к систематической ошибке в анализе [68]. К сожалению, специализированного программного обеспечения для моделирования популяционного анализа, которое существует в большом количестве для диплоидов [69], для полиплоидов представлено очень мало и, зачастую, создается исследователями самостоятельно для каждой конкретной задачи [70].

Для удобства работы с анализом молекулярно-генетических характеристик популяций полиплоидных видов может быть выбрано изучение митохондриальных линий. Исследование популяции по материнской линии дает обширное представление о ее состоянии, стабильности и демографической истории.

1.5. Современное состояние популяционных исследований полиплоидных речных рыб

Необходимость решительных мер по сохранению популяций стерляди и сибирского осетра требует обширных исследований как диких популяций, так и рыбных хозяйств. Данные о генетическом разнообразии в рыбных хозяйствах особенно важны при реализации программ, включающих выпуск молоди в дикую популяцию. Так как внедрение в популяцию новых гаплотипов может приводить к возникновению такого явления как аутбредная депрессия, а при генетическом обеднении популяций – к инбредной депрессии [2], поэтому необходимо тщательно изучить эти процессы, прежде чем осуществлять выпуск молоди из рыбных хозяйств.

Несмотря на актуальность данной темы, исследований популяций стерляди и сибирского осетра довольно мало. Наиболее изучены популяции стерляди в западной части ареала – в Дунае [9], Днестре [71] и в Волге [35]. Популяции сибирских рек изучены очень слабо [10]. Особи из Волги чаще всего используются для разведения в

рыбных хозяйствах, поэтому большая часть исследований по популяциям Волги проводилась именно на особях из неволи [72], что, несомненно, дает неверную картину состояния дикой популяции определенного речного бассейна.

Одно из исследований популяций стерляди на Дунае проводилось группой немецких ученых с целью получения предпосылок для развития программ по сохранению реликтовой дунайской популяции стерляди [8]. По филогенетическому и популяционному анализу образцов, полученных из разных районов бассейна Дуная, Волги и Кубани, выполненному по последовательностям микросателлитной и мтДНК, был получен вывод о том, что только 77% процентов популяции стерляди Дуная являются автохтонными, остальные 23% - имеют сходство с образцами из Волги, что говорит о возможной контаминации популяции из-за не отслеживаемого выпуска молоди из рыбных хозяйств в естественную среду. Подобные ситуации могут приводить к увеличению степени аутбридинга, что негативно сказывается на популяционном разнообразии [2]. Кроме того, авторами было отмечено, что в отличие от популяции Волги, имеющей предпосылки к разделению на субпопуляции внутри бассейна, дунайская популяция стерляди проявляет признаки панмиктической, особенно в верхнем течении Дуная, где, как считается, преобладает реликтовая популяция стерляди.

В работе, выполненной на выборке стерляди из Волги, было показано, что в популяции нижнего течения Волги можно выделить несколько субпопуляций, основываясь на меристических и пластических признаках рыб, а также на исследовании инвазии стерляди паразитами [35]. Авторы находят существенные отличия между образцами стерляди из выбранных участков в нижнем течении Волги, что позволяет им сделать вывод о наличии субструктур внутри волжской популяции стерляди. Но применение молекулярных маркеров не подтвердило эту теорию. В случае Волги нельзя не отметить влияние на структуру популяций большого количества плотин, построенных в ее бассейне в течение XX века [73].

Исследования по аквакультурным образцам стерляди выполнялись только по европейской части России, анализ ядерных молекулярных маркеров не выявил значительной разницы между природными и аквакультурными популяциями, но показал сниженное генетическое разнообразие в рыбных хозяйствах [15].

В одном из таких исследований, направленном на подготовку программы восстановления популяции стерляди в Днестре, генетический анализ популяции проводился также с использованием микросателлитных маркеров [10]. Были рассчитаны генетическое разнообразие и генетические дистанции между популяциями стерляди из Днестра, Днепра, Дуная, Волги, Камы и Оби. Филогенетическое древо, построенное методом «ближайшего соседства» (Neighbor-Joining) выявило два кластера: один из них объединяет популяции Днестра, Днепра, Оби и Камы, а второй – популяции Дуная и Волги. Подобные предварительные исследования являются отправной точкой в создании планов восстановления любой популяции.

Сибирский осетр (*A. baerii*) широко распространен в аквакультуре и активно изучается как объект получения гибридов осетровых [74,75]. Природные популяции сибирского осетра изучены менее подробно, чем популяции стерляди. Большая часть исследований была проведена в ходе различных экспедиций и работ по мониторингу еще в XX веке [40–42]. Исследования были направлены в первую очередь на морфологическое описание популяций, и некоторые выводы впоследствии были опровергнуты с применением молекулярно-генетических данных [76]. Исследования Барминцевой А.Е. и Мюге Н.С. сибирского осетра на всем ареале показали изоляцию популяций разных рек по митохондриальным и ядерным маркерам [43], а также выявили явное снижение генетического разнообразия вида при разведении в аквакультуре [14].

Еще одно важное популяционное исследование представляет информацию о гибридах между стерлядью и сибирским осетром (*A. baerii*), образующихся в естественных популяциях. Ареал сибирского осетра не доходит до европейских рек, однако в последние десятилетия стало очень популярным его разведение в аквакультуре. Так как многие рыбные хозяйства расположены в непосредственной близости к воде, то во время затоплений возможен выход рыб из хозяйства в дикую популяцию. Известно, что осетровые способны к межвидовой гибридизации [77]. Случаи гибридизации являются серьезной угрозой для выживания малочисленных изолированных популяций [78]. Добавление чужеродных аллелей к локальному генному пулу приводит к разбавлению и/или необратимой потере определенных аллелей или аллельных комбинаций. Существуют противоречивые данные о гибридах между стерлядью и сибирским осетром, поскольку, теоретически, такие гибриды должны

обладать некратным числом гомологичных хромосом, то предполагается их полная стерильность [78]. Тем не менее в последних работах было показано, что возможно получение фертильных гибридов от двух видов с разным уровнем ploидности, стерлядью (*A. ruthenus*) и калугой (*H. dauricus*) в условиях аквакультуры. Способность гибридов осетровых, происходящих от видов с разным уровнем ploидности, давать нередуцированную икру имеет большое значение для понимания полиploидной эволюции осетровых [79].

Таким образом, недавние исследования показывают, что популяции осетровых разных рек изолированы, но имеется небольшой обмен между разными популяциями [8,10]. Популяции рек Сибири ранее, в течение многих лет, изучались только с использованием морфологических признаков, таким образом, предполагались различные морфологические формы и подвиды стерляди и сибирского осетра [11,12]. Для сибирского осетра предположения о выделении подвидов позже были опровергнуты в работе [13]. Для стерляди необходимо пересмотреть эти данные с применением методов молекулярной биологии.

1.6. Методы филогенетического анализа, применяемые в популяционных исследованиях

1.6.1. Основные способы выравнивания последовательностей

Любой подход в филогенетическом анализе начинается с выравнивания анализируемых последовательностей нуклеотидов или аминокислот. Под выравниванием последовательностей понимают такое размещение последовательностей друг относительно друга, при котором визуализируются сходные участки. Выравнивание коротких или очень похожих последовательностей может быть сделано вручную, простым сравнением каждой позиции нуклеотидов или аминокислот. Более сложной задачей является выравнивание длинных, высоковариабельных или множества последовательностей. Для этого разработаны различные вычислительные подходы. Они делятся на две категории: глобальное и локальное выравнивание. При глобальном выравнивании происходит сравнение каждого нуклеотида в каждой последовательности, и оно является наиболее эффективным в том случае, когда последовательности похожи и имеют примерно равный размер. Локальное выравнивание, напротив, внутри длинных последовательностей определяет схожие

районы. Локальное выравнивание более предпочтительно, но в этом методе, поиск схожих районов последовательностей может быть проблематичен [80]. Кроме того, для решения проблемы выравнивания последовательностей применяются разнообразные вычислительные алгоритмы, такие как динамическое программирование и вероятностные методы, предназначенные для крупномасштабного поиска в базах данных, но ни один из них не гарантирует нахождения наилучших совпадений для выравнивания нуклеотидных последовательностей.

Методы парного выравнивания используются для поиска наилучших совпадений частей (локально или глобально) в двух анализируемых последовательностях. Парное выравнивание может быть применено одновременно только к двум последовательностям. Например, такой подход используется при поиске в базах данных последовательностей с высокой степенью схожести с анализируемой [81]. Одним из способов количественной оценки эффективности парного выравнивания является «максимальное уникальное соответствие» или самая длинная подпоследовательность, которая встречается в обеих последовательностях в данном анализе. Более длинные последовательности максимального уникального соответствия обычно также отражают и более близкую взаимосвязь [81].

Множественное выравнивание расширяет возможности парного выравнивания, позволяя включать в анализ одновременно больше двух последовательностей. Множественное выравнивание является неотъемлемой частью филогенетического анализа. Визуальное отображение результатов выравнивания представляет мутационные события как точечные однонуклеотидные замены (SNP), вставки и делеции нуклеотидов. Такой тип выравнивания использует более сложные вычислительные алгоритмы, как эвристические, так и итеративные.

1.6.2. Алгоритмы выравнивания

Один из подходов, применяющих эвристический алгоритм – прогрессивное выравнивание [82]. Он включает две стадии: на первой – взаимоотношения между последовательностями отображаются в виде дерева, называемого путеводным деревом, а на второй строится множественное выравнивание путем постепенного добавления последовательностей в процессе построения множественного выравнивания. Этот метод довольно эффективный для применения на большом количестве последовательностей

(10^2 - 10^3). Качество выравнивания, полученного прогрессивным методом, напрямую зависит от качества последовательностей и исходного выравнивания, поскольку в результирующее выравнивание они попадают в неизменном виде, из-за чего могут накапливаться ошибки. Несмотря на снижение точности результата, благодаря таким приближениям, возрастает эффективность выравнивания [81].

Самым популярным среди методов прогрессивного выравнивания является семейство Clustal [83]. Алгоритмы этого семейства работают, анализируя последовательности в целом, а затем используют, например, метод ближайших соседей (Neighbor-joining) для вычисления матрицы расстояний. Затем из числа последовательностей в матрице строится путеводное дерево, которое в дальнейшем используется для построения множественного выравнивания путем постепенного добавления последовательностей в порядке их схожести [84].

Другой метод прогрессивного выравнивания – T-Coffee [85]. Он уступает в скорости всем алгоритмам семейства Clustal, но позволяет получить более точные выравнивания эволюционно более далеких последовательностей. Данный метод строит библиотеку парных выравниваний, на основании которой происходит построение множественного выравнивания [85].

Так как оба метода, Clustal и T-Coffee являются эвристическими, они не гарантируют получения оптимального выравнивания, его биологическое значение и качество иногда очень трудно оценить.

Перейдем к рассмотрению «итеративных» методов множественного выравнивания, которые схожи в принципе работы с прогрессивными методами, но неоднократно перестраивают посчитанные попарные выравнивания после добавления новых последовательностей, что повышает качество множественного выравнивания [81].

К итеративным методам относятся Parallel PRRN, использующий для оптимизации множественного выравнивания алгоритм hill climbing. PRRN показывает большую эффективность, когда перестраивает уже существующее выравнивание, посчитанное более быстрым алгоритмом [86]. DIALIGN - использует другой подход, сосредотачиваясь на локальных выравниваниях подпоследовательностей или мотивов [87]. Еще один популярный и высокоэффективный метод множественного выравнивания – MUSCLE (multiple sequence alignment by log-expectation) использует

более точные оценки расстояния (Kimura distances), для выяснения взаимосвязи между двумя последовательностями [88].

В настоящее время, наиболее оптимальным является алгоритм MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) [89]. Метод, на котором он основан, позволяет быстро находить участки гомологии. Он предлагает упрощенную систему подсчета параметров, которая хорошо работает для увеличения скорости и повышения точности выравнивания, даже для последовательностей, имеющих большие вставки или делеции, а также для филогенетически давно разошедшихся последовательностей одинаковой длины [89].

1.6.3. Методы филогенетической реконструкции

Следующим этапом, после выравнивания последовательностей, является подсчет эволюционных (генетических) дистанций между ними. Эти дистанции можно интерпретировать как филогенетические отношения между последовательностями. Чем меньше дистанции между двумя анализируемыми последовательностями, тем более родственны они друг другу. Чтобы установить эволюционные дистанции, используются различия в последовательностях нуклеотидов или аминокислот. Соотношение различающихся нуклеотидов или аминокислот в пересчете на длину анализируемой последовательности и выраженное в частях от единицы или в процентах называется эволюционной дистанцией (*p*-distance). Существуют ограничения и недостатки при использовании дистанций:

А) Дистанция не может превышать 1 (100%), представляя случай, когда все нуклеотиды или аминокислоты различны в анализируемых последовательностях.

Б) Различия, которые мы видим при анализе последовательностей, не всегда являются результатом одной мутации. В данной позиции могло произойти несколько замен, в том числе, отсутствие различий в определенных позициях последовательностей не гарантирует, что в них не происходило замен, т.к. могли произойти обратные, параллельные и конвергентные мутации.

В) Различные замены происходят с разной вероятностью. Так, трансверсии более редки и менее вероятны, чем транзиции, то есть занимают больше времени. Таким образом, дистанции между последовательностями, различие между которыми является

трансверсией, будут больше, чем между последовательностями, замены в которых являются транзициями.

Г) Как было показано в некоторых работах, скорость замен может быть различной в разных позициях последовательности [90].

Все перечисленные недостатки говорят о том, что наблюдаемые p -distance меньше действительной эволюционной дистанции D . Чтобы получить более реальную оценку эволюционной дистанции D используют различные математические модели эволюции нуклеотидов.

1.6.4. Модели семейства GTR

Нуклеотидная замена – результат мутации, прошедшей отбор и закрепившейся в геноме. Модели нуклеотидных замен можно разделить на два основных подхода – параметрический, разработанный для нуклеотидных последовательностей, и эмпирический, подходящий для оценки родства аминокислотных последовательностей [91]. В данном обзоре будут рассмотрены только некоторые параметрические модели замен, которые были актуальны в рамках проведенной работы. Частота замен в параметрической модели определяется как функция от некоторых параметров, оцененных для каждой группы анализируемых данных. Можно выделить два класса параметров: параметры вероятности замен и параметры скорости мутаций. Самые часто используемые модели относятся к семейству GTR (General Time-Reversible) [92]. Принцип моделей GTR заключается в оценке четырех параметров для частот нуклеотидов и шести параметров для скорости замен между нуклеотидами.

Первая и наиболее простая модель эволюции нуклеотидных последовательностей - модель Джукса-Кантора (JC69) [93]. Согласно этой модели, за единицу времени любой нуклеотид может быть заменен на любой другой с равной вероятностью, например, α . То есть, модель JC – однопараметрическая. Эта модель учитывает множественные замены в одной нуклеотидной позиции, таким образом, внося коррекцию в p -дистанцию. Ее недостатками является пренебрежение разными частотами транзиций и трансверсий, а также неравенством частот встречаемости нуклеотидов в реальных последовательностях.

Модель Кимуры (K80) [94] чуть более усложненная. Она является двухпараметрической и учитывает различную частоту транзиций (α) и трансверсий (β).

Частота встречаемости каждого нуклеотида здесь также остается неучтенной и принимается за 25%. Как и модель Джукса-Кантора, для филогенетического анализа реальных данных используется очень редко.

Далее Таджимой и Неи была предложена модель (TN84), которая учитывает разную частоту встречаемости каждого из четырех нуклеотидов, но она не учитывает, какой нуклеотид изначально находился в данной позиции [95]. Для нее было принято, что частота замены любого нуклеотида на А равна α , на Т – β , на С – γ , на G – δ .

Более сложная модель Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) [96] помимо того, что учитывает поправки введенные в предыдущих моделях замен, также позволяет использовать дополнительные параметры, например влияние каждого из четырех азотистых оснований на частоту трансверсий и транзиций.

И самая сложная из представленных на настоящий момент моделей – общая модель General Time Reversible (GTR), которая задает четыре параметра для различных частот нуклеотидов и шесть параметров для различных частот замен между нуклеотидами [97–99].

Кроме того, любая из моделей замен может быть дополнена оценкой вариации частот между позициями нуклеотидов. Скорость замен различается в разных районах последовательности. Позиции, которые находятся под постоянным влиянием положительного отбора, чаще подвержены мутациям, чем консервативные участки, на которые действует отрицательный отбор. Частота замен в различных позициях варьирует согласно γ -распределению [100–103], его форма позволяет учесть вариацию частоты замен в различных позициях.

Говоря в общем, не существует одной оптимальной модели для любых случаев. Сложные модели, конечно, лучше описывают данные, но на практике не всегда их результат значительно отличается от того, что может быть получен более простой моделью. При использовании сложных моделей с большим числом параметров в итоговом результате неизбежно будет возрастать стандартное отклонение, рассчитываемое для каждого из них. Хорошим правилом при выборе модели замен является использование нескольких различных моделей и сравнение их результатов с целью выбрать оптимальную для анализируемого набора данных [90].

Существует набор программ, которые на основании выравнивания подбирают наилучшую модель замен, например jModelTest [104], PartitionFinder [105], MEGA [106].

1.6.5. Дистанционные методы

В дистанционных методах устанавливаются попарные дистанции для анализируемых последовательностей. Помимо этого, дистанционные методы позволяют строить филогенетические деревья на основе не прямых данных о генетических дистанциях, если эти данные можно представить в виде матрицы дистанций. Существуют различные алгоритмы для перевода матрицы дистанций в филогенетическое древо.

Самый простой – UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) [107]. В данном методе для восстановления топологии древа необходимо строго соблюдать принцип молекулярных часов в эволюции анализируемых последовательностей. Алгоритм базируется на последовательном группировании и поэтапном построении древа. В настоящее время он практически не используется, так как имеет низкую эффективность относительно других методов. Из UPGMA развился схожий с ним метод трансформируемой дистанции (transformed distance method) [108], он дает возможность учитывать внешнюю группу для исследуемой, а также в некоторой степени пренебрегать моделью молекулярных часов в эволюции анализируемых последовательностей. Но данный метод также не получил широкого распространения вследствие низкой эффективности.

Еще один дистанционный метод – метод минимальной эволюции. Его принцип заключается в том, что наиболее вероятный вариант эволюции группы последовательностей – это тот, при котором происходит минимальное число эволюционных событий [109,110]. Данный метод подразумевает построение всех теоретически возможных деревьев, а из них происходит выбор древа с наименьшей суммой длин всех ветвей. Чем больше последовательностей будет взято в анализ, тем более затратным по времени он будет, так как при использовании прямого подхода, возрастает число теоретически возможных топологий [111]. Применение методов, осуществляющих отсев топологий, которые не ведут к минимизации суммы длин ветвей, помогает решить эту проблему.

1.6.6. Методы филогенетической реконструкции

В настоящее время широкое применение имеют три метода – метод присоединения соседей, метод максимального правдоподобия и байесовский метод. Рассмотрим подробнее каждый из них.

Алгоритм метода присоединения соседей (*neighbor-joining*) – дистанционный, начинает построение древа с полностью неразрешенной топологии, используя входящую матрицу дистанций. Два ближайших различных таксона соединяются в новый узел, который после присоединяется к центральному узлу. Затем подсчитывается новая матрица дистанций по полученной топологии и этот процесс повторяется до полного построения древа [112]. Достоинствами данного метода являются простота и скорость, что снижает нагрузку на вычислительные ресурсы. Недостатки заключаются в невысокой точности построения в сравнении с более сложными методами [113].

Метод максимального правдоподобия (*maximum-likelihood*) относится к методам, анализирующим дискретные признаки. Он использует модели замен для построения древа, основываясь на оценке правдоподобия присутствия определенного нуклеотида в конкретной позиции. Применяя функцию правдоподобия, можно определить вероятности нахождения нуклеотидов во всех анализируемых последовательностях и, исходя из них, построить древо являющееся максимально правдоподобным [114,115]. Метод максимального правдоподобия рассматривает отдельно каждый нуклеотид, а не дистанции между последовательностями, что позволяет повысить достоверность полученного древа, но в то же время это негативно сказывается на скорости подсчета.

Байесовский метод использует функцию правдоподобия для подсчета апостериорной вероятности получения той или иной топологии древа, основываясь на модели замен. Применение метода марковских цепей [116] позволяет построить большое количество вероятных топологий, из которых в итоге выбирается одна, с наибольшей апостериорной вероятностью [117]. Достоинства метода заключаются в том, что он учитывает филогенетическую неопределенность, а также использует сложные модели эволюции нуклеотидных последовательностей. Недостатком можно считать высокую чувствительность к неверно выбранной модели замен, а также низкую скорость вычисления [118].

Таким образом, подход к выбору метода реконструкции деревьев должен быть основан на объеме входных данных и возможностях вычислительных ресурсов.

Конечно, сложные методы более предпочтительны. Получение одинаковой топологии древа разными методами свидетельствует о том, что конечное древо описывает реальные эволюционные события.

1.6.7. Методы проверки статистической достоверности

Для оценки надежности филогенетического древа применяются статистические подходы, основанные на методах повторных выборок, самым популярным из которых является бутстрэп-анализ (bootstrap analysis). Суть метода заключается в создании набора выравниваний, которые состоят из нуклеотидов, взятых из случайных позиций исходного выравнивания. Для достоверности считается необходимым построение от 100 до 1000 таких наборов [90]. По полученным выравниваниям строятся филогенетические деревья таким же методом, как анализируемое древо. Количество одинаковых узлов, обнаруженных при сравнении полученных деревьев с анализируемым, показывает бутстрэп-поддержку расхождения двух ветвей. Достоверным значением поддержки считается 90% совпадающих топологий [119].

1.6.8. Популяционный анализ

Для проведения мероприятий, направленных на поддержание видов, находящихся под угрозой исчезновения, необходимо понимать их популяционную структуру. Структура популяции описывается такими параметрами как индексы молекулярного разнообразия, индекс фиксации (F_{st}), распределение попарных различий, время экспансии и динамика популяций. Оценка этих параметров проводится с помощью различных программ, например, Arlequin [120], DnaSP [121].

Молекулярное разнообразие в популяции оценивается такими индексами как нуклеотидное (P_i) и гаплотипическое (H) разнообразие. Нуклеотидное разнообразие показывает степень полиморфизма последовательностей ДНК внутри популяции. Оно определяется средним количеством нуклеотидных различий на сайт между двумя последовательностями ДНК во всех возможных парах анализируемых последовательностей [122]. Гаплотипическое разнообразие – это мера уникальности определенного гаплотипа в данной популяции [123].

Индекс фиксации F_{st} показывает меру различий между популяциями. F_{st} оценивается, как отношение разницы нуклеотидного разнообразия между и внутри

популяции, к нуклеотидному разнообразию между популяциями. Индекс фиксации позволяет оценить степень изоляции двух популяций [124].

Для оценки динамики изменения численности популяций применяются два метода: распределение попарных различий (mismatch distribution) [125] и Bayesian Skyline Plot [126]. Распределение попарных различий указывает была ли в популяции внезапная экспансия и позволяет примерно оценить время этого события. Bayesian Skyline Plot оценивает изменение численности популяции во времени, а также может указать на возможные периоды резкого изменения численности популяции.

1.7. Исследование субфоссильных проб промысловых видов

Осетровые являются важным промысловым объектом уже несколько столетий. При раскопках на территории бассейна р. Волга во многих археологических памятниках позднего голоцена были обнаружены субфоссильные образцы костей разных видов осетровых [127,128], для многих объектов удавалось также установить биологические показатели [129]. Исследование таких параметров может оказать существенный вклад в описание антропологического влияния на развитие организмов.

В работе Д. Н. Шаймуратовой было показано, что вдоль бассейна Волги были обнаружены костные остатки пяти видов осетровых рыб, обитавших в прошлом – это русский осетр (*A. gueldenstaedtii*), шип (*A. nudiventris*), стерлядь, севрюга (*A. stellatus*) и белуга (*H. huso*) [130,131]. Первое место среди всех промысловых рыб, судя по количеству костных останков, занимала стерлядь. Анализ количества найденных образцов показал, что промысел этого вида имел тенденцию к увеличению от периода к периоду. Сравнение средних размеров стерляди из археологических памятников с размерами современной стерляди из исследованного региона показывает, что стерлядь из древних уловов превышала средние размеры стерляди, выловленной в первой половине XX в. (до зарегулирования рек Волга и Кама) [132]. Отмечается, что в зависимости от того, каким промыслом занималось население, проживающее в то или иное время, различаются количество уловов, а также вид снастей. Это объясняет различие между возрастными и морфометрическими параметрами исследованных выборок разных периодов.

Данные по субфоссильной стерляди из средней Волги и нижней Камы (до их зарегулирования) полученные Д. Н. Шаймуратовой [132] подтверждают результаты

более ранних исследований [133–135] о сложной внутрипопуляционной структуре стерляди,

Для широко распространенного рода *Carassius* также проводились исследования субфоссильных образцов. Древние костные остатки представителей рода не всегда удавалось идентифицировать до видовой принадлежности (*Carassius* sp.). Археоихтиологические данные [130,131] и материалы ихтиологических исследований в XVIII в. [136], показали полное отсутствие серебряного карася до начала XIX в.н.э. на территории Среднего Поволжья.

Изучение субфоссильных остатков животных помогает расширить представление об особенностях биологии видов и их эволюционных изменениях. Сравнение исследованных биологических параметров ископаемых и современных форм, позволяет проследить изменения, которые произошли в популяциях.

1.8. Заключение по обзору литературы

Полиплоидия является широко распространенным явлением у рыб. Дупликация геномов, вероятно, играет немалую роль в эволюции позвоночных, и особенно широкого разнообразия, наблюдаемого у рыб.

Стерлядь и сибирский осетр – ценные промысловые виды, находящиеся под угрозой исчезновения. Исследования отмечают присутствие осетровых в выловах с IV века. Их численность стремительно снижается на всем ареале. Изучение представителей этих видов в разных речных бассейнах часто показывает изоляцию между популяциями разных рек. Маркерами для оценки генетического разнообразия популяций были выбраны различные регионы мтДНК и микросателлитные локусы. Базальное положение осетровых среди лучеперых рыб делает их модельным видом, подходящим для исследования эволюционной изменчивости позвоночных.

Осетровые – ценный объект пищевой промышленности, и в настоящее время активно развивается их введение в аквакультуру. Для развития рыбоохранных мероприятий необходим контроль генетического разнообразия, чтобы избежать инбредной депрессии вследствие близкородственных скрещиваний. Кроме того, процедуры по выпуску аквакультурных рыб в дикие популяции должны проводиться в соответствии с принадлежностью особей к той или иной популяции.

Серебряный карась принадлежит к самой крупной ветви лучеперых рыб – костистым рыбам. Относительно недавно в линии карасей и карпов произошла полногеномная дупликация, а современные формы серебряного карася представляют собой линии с разной ploидностью. Вид также является ценным в промысле, что привело к его интродукции на большей части современного ареала. Это отразилось на том, что во многих популяциях серебряного карася наблюдается эффект основателя. Другой интересной особенностью этого вида является присутствие партеногенетических популяций, до сих пор неясно, какие факторы лежат в основе определения пола у данного вида.

Работа с видами, находящимися под угрозой исчезновения сопряжена со сложностями сбора образцов из природных популяций. Образцы могут быть получены только в ходе биомониторинга.

Биоинформатический анализ геномов полиплоидных организмов является непростой задачей для исследователей, так как ядерные гены обычно представлены несколькими копиями. Поэтому для описания популяционной структуры вида и реконструкции демографической истории популяций часто применяют митохондриальные маркеры. Исследование внутривидовых и межвидовых филогенетических взаимоотношений играет важную роль в разработке мероприятий по восстановлению вида, а также поддержанию генетического разнообразия в популяциях.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы, использованные в работе

Дикие образцы стерляди из Обь-Иртышского бассейна, реки Енисей и сибирского осетра из Обь-Иртышского бассейна, рек Енисей, Лена, Колыма, Яна, Индигирка были собраны в ходе программ экологического мониторинга, выполняемых Государственным научно-производственным центром рыбного хозяйства в период с 2012–2018 гг. Образцы стерляди из реки Волга взяты из коллекции Ульяновского государственного педагогического университета. Образцы субфоссильных проб стерляди с западной части ареала предоставлены лабораторией биомониторинга Института проблем экологии и недропользования АН РТ. Костные образцы стерляди было получены с 16 точек археологических раскопок в период 2002–2016 гг вдоль русла Средней и Нижней Волги.

Образцы осетровых рыб из аквакультуры были приобретены на рыбных фермах в г. Тюмени, г. Северске и Томской области (ООО НПО "Томэко").

Образцы тканей серебряного карася из Обь-Иртышского бассейна были собраны в ходе программ экологического мониторинга, выполняемых Государственным научно-производственным центром рыбного хозяйства в период с 2016–2018 гг.

Для выделения ДНК использовались только плавники рыб. Протокол был одобрен комитетом по этике экспериментов на животных Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН.

Олигонуклеотиды ДНК, использованные в работе, были синтезированы фирмой «Биоссет» (Табл. 1П).

2.2. Методы

2.2.1. Выделение ДНК из сухих плавников и плавников в спирте рыб

Плавники рыб измельчали ножницами и выделяли ДНК на колонках DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) в соответствии с протоколом производителя.

2.2.2. Амплификация контрольного района мтДНК

Праймеры CR1m и CR2m были подобраны на основе публикаций [137] с модификациями, основываясь на последовательности полного митохондриального генома стерляди [72].

Праймеры L15923 и H16150 были подобраны на основе публикации [138].

Реакционная смесь для полимеразной цепной реакции в объеме 40 мкл содержала следующие реагенты: 10X ПЦР-Gold буфер, 4 мкл 4дНТФ (дАТФ, дГТФ, дСТФ, дТТФ) (2мМ), 2 мкл каждого из соответствующих праймеров (10μМ), 40 нг исследуемого образца ДНК, 0,4 мкл TaqGold-полимеразы, ddH₂O до объема 40мкл. Полученную реакционную смесь инкубировали в амплификаторе в следующих условиях реакции: 1 цикл – 95 °С (3.00 мин); 35 циклов – 94 °С (30 сек), температура отжига праймеров (30 сек), 72 °С (60 сек), 72 °С (5 мин); 10 °С (хранение).

2.2.3. Электрофорез в агарозном геле

К 1 г агарозы добавляли 100 мл 1×ТАЕ (40 мМ Tris-base, CH₃COOH (до конечного рН раствора 7,6), 1 мМ ЭДТА), смесь нагревали до полного растворения агарозы, охлаждали до 50 – 60 °С и добавили бромид этидия до концентрации 2 мкг/мл. Раствор заливали в ванночку для геля, предварительно установив в ней гребенку для формирования карманов. После полимеризации гель переносили в камеру для электрофореза. Исследуемые образцы ДНК предварительно смешивали с буфером для нанесения (0,05% раствора бромфенолового синего в 60% глицерине и 40% ТАЕ буфере), тщательно перемешивали и помещали в карманы геля. Электрофорез вели в 1×ТАЕ буфере при напряжении 5 В/см².

Для определения длины фрагментов ДНК в дополнительный карман геля добавляли 1 мкл маркера длины 1000 п.н. (Медиген). Результаты визуализировали с помощью трансиллюминатора (Syngene) в УФ-свете.

2.2.4. Очистка ПЦР-продуктов

Очистка ПЦР-продуктов из реакционной смеси проводилась с использованием реагентов ExoSAP-IT (Affymetrix) по протоколу производителя.

2.2.5. Секвенирование по методу Сэнгера

Реакционная смесь для секвенозной реакции в объеме 10 мкл содержала следующие реагенты: 2 мкл 5× BrightDye buffer, 0,25 мкл BrightDye™ Terminators v1.1; 1,25 мкл соответствующего праймера (10 мМ); 1,2 мкл исследуемого образца ДНК, ddH₂O до 10 мкл. Полученную реакционную смесь инкубировали в амплификаторе в следующих условиях реакции: 1 цикл – 96 °С (0,01 мин); 35 циклов – 96 °С (10 сек), 57

°C (10 сек), 60 °C (4 мин); 10 °C (∞). Полученный продукт реакции очищали с использованием BigDye X Terminator Purification Kit по протоколу производителя.

Все последовательности мтДНК стерляди и серебряного карася, описанные впервые в данной работе, были загружены в GenBank. Для стерляди из Обь-Иртышского бассейна под номерами KU984263-KU984330, для стерляди из бассейна Енисея под номерами MG563822-MG563840, для серебряного карася MF987725, MT062975, MT062976.

2.2.6. Приготовление библиотек мтДНК под индексами Illumina

Мы использовали две системы пробоподготовки библиотек мтДНК.

2.2.6.1. Геномную ДНК в концентрации 20 нг/мкл в объеме 100 мкл фрагментировали ультразвуком на приборе Bioruptor до размера 600 п.н. (7 циклов по 15 сек, с перерывом 90 сек). Отбирали 400 нг в объеме 15 мкл и проводили пробоподготовку по протоколу TruSeq Nano DNA Library Prep. После чего проводили обогащение готовых библиотек мтДНК.

2.2.6.2. С геномной ДНК амплифицировали мтДНК в виде четырех фрагментов примерно одинакового размера (в зависимости от возможности подобрать праймеры на данный участок). ПЦР-продукт нужного размера вырезали из агарозного геля, создавали эквимольную смесь четырех фрагментов мтДНК. Полученную смесь в объеме 100 мкл фрагментировали ультразвуком на приборе Bioruptor до размера 400 п.н. (4 цикла по 30 сек, с перерывом 30 сек). Отбирали 400 нг и проводили пробоподготовку по протоколу TruSeq Nano DNA Library Prep.

2.2.7. Обогащение библиотек

2.2.7.1. Получение матрицы для обогащения

С помощью ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) получали длинные фрагменты мтДНК стерляди, которые использовали, как матрицу для обогащения библиотек. В объеме 100 мкл замешивали следующие реагенты: 5× HF-буфер, 10 мкл 4дНТФ (дАТФ, дГТФ, дСТФ, дТТФ) (2,5 мМ), 1 мкл полимеразы Phusion HF (Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)), делили реакционную часть на 4 части, добавляли 5 мкл каждого из соответствующих праймеров (10 мкМ), 5 мкл ДНК в концентрации 50 нг/мкл, ddH₂O до

объема 25 мкл. Полученную реакционную смесь инкубировали в амплификаторе в следующих условиях реакции: 1 цикл – 98 °С (2 мин); 35 циклов – 98 °С (15 сек), 64 °С (30 сек), 72 °С (6 мин), 72 °С (5 мин); 10 °С (хранение).

ПЦР-продукты очищали на колонках QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) по протоколу производителя. Получали эквимольярную смесь четырех фрагментов мтДНК.

2.2.7.2. Биотинилирование в реакции ник-трансляции

Проводили с использованием BioNick Labeling System (Invitrogen) по протоколу производителя.

Очистку проводили на колонках QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) по протоколу производителя.

2.2.7.3. Гибридизация

Гибридизацию ДНК проводили на магнитных микрогранулах с иммобилизованным стрептавидином (Dynabeads® M-280 Streptavidin). Предварительно проводили иммобилизацию биотинилированной ДНК: на 50 мкл магнитных микрогранул – 1,5 мкг биотинилированной ДНК. Биотинилированную ДНК предварительно денатурировали 5 мин при 95 °С, охлаждали и приливали к магнитным микрогранулам, перемешивали и добавляли раствор 20×SSC до конечной концентрации 2×SSC, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 20 мин. Связывание проходило за 15-20 мин.

После этого осаждали магнитные микрогранулы, собирали супернатант и 3 раза промывали микрогранулы 2×SSC, супернатант собирали. Ресуспендировали магнитные микрогранулы в 2×SSC из расчета 10 мкл на пробу. Определив концентрацию в супернатанте, определяли количество связавшейся биотинилированной ДНК.

ДНК обогащаемой библиотеки, полученной пробоподготовкой по протоколу TruSeq Nano DNA Library Prep, денатурировали 5 мин при 95 °С, охлаждали до 0 °С, добавляли к суспензии магнитных микрогранул с иммобилизованной мтДНК, добавляли 3 мкл 20×SSC и перемешивали.

Гибридизацию проводили в течение 48 часов при 65 °С.

2.2.7.4. Очистка продуктов гибридизации

Магнитные микрогранулы промывали 2 раза 100 мкл 2×SSC, инкубировали по 5 мин при 65 °С, 2 раза 100 мкл 0,2×SSC, инкубировали по 5 мин при комнатной температуре. Элюировали в 30 мкл ddH₂O. С 27 мкл элюата проводили амплификацию с Phusion HF Polymerase.

Реакционная смесь для обогащения продуктов содержала в объеме 40 мкл следующие реагенты: 5х HF-буфер, 4мкл 4дНТФ (дАТФ, дГТФ, дСТФ, дТТФ) (2,5мМ), 5 мкл праймеров Illumina, 27 мкл ДНК пробы, 1 мкл полимеразы Phusion HF, ddH₂O до объема 50 мкл. Полученную реакционную смесь инкубировали в амплификаторе в следующих условиях реакции: 1 цикл – 98 °С (2 мин); 20 циклов – 98 °С (30 сек), 60 °С (30 сек), 72 °С (30 сек), 72 °С (5 мин); 10 °С (∞).

ПЦР-продукты очищали на колонках QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) по протоколу производителя.

2.2.8. Выделение ДНК и амплификация ДНК субфоссильных проб

Выделение ДНК из субфоссильных проб проводилось в специализированном боксе. Перед выделением ДНК костные образцы были подвергнуты ультрафиолетовой обработке по 30 минут с каждой стороны. После этого образец помещался в несколько слоев алюминиевой фольги (также предварительно обработанной УФ) и измельчался молотком до получения костного порошка.

Экстракцию древней ДНК проводили по методу Янга с соавторами [139] с модификацией по Сандерсону [140]: этап инкубации костного порошка в лизирующем буфере при 37 °С отсутствовал; в лизирующем буфере EDTA заменяется на (NH₄)₄EDTA (этилендиаминтетраацетат тетрааммония) для сокращения времени лизиса, додецилсульфат натрия заменяется на лауроилсаркозинат натрия в качестве детергента; очистка экстрагированной ДНК производится на спин-колонках с кварцевой мембраной MinElute (Qiagen, выделение ДНК от 70 п.н. до 4 т.п.н.) вместо спин-колонок с кварцевой мембраной QIAquick (Qiagen, выделение ДНК: от 100 п.н. до 10 т.п.н.).

300 мг костного порошка инкубировали в 4 мл буфера для лизиса, содержащего 0,45 М (NH₄)₄EDTA, 0,5% лауроилсаркозината натрия, 150 мкг/мл протеиназы К в термошейкере (настольный орбитальный шейкер Max 4450 (Thermo Fisher Scientific)) при 55 °С до полного растворения костного порошка (около 8 часов). После этого

раствор костного порошка центрифугируется при 2800g в течение 60 минут, надосадочную жидкость отбирали и концентрировали до объема 150 мкл на центрифужном концентраторе Amicon® Ultra-15 3K (Merck (Millipore)) (около 1,5 часов). Затем в концентратор добавляли 2,5 мл воды Milli-Q и образец снова концентрировали до объема 150 мкл (около 1 часа).

Очистку ДНК проводили на спин-колонках с силикагелевой мембраной MinElute (Qiagen) с использованием набора MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) и в соответствии с протоколом производителя со следующими небольшими изменениями: ДНК очищали с помощью 750 мкл Buffer PE (промывочный буфер, Qiagen) дважды вместо одного; перед стадией элюции ДНК буфер EB (с 0,05 % Tween 20 для уменьшения связывания ДНК со стенками пробирки) нагревали до 37 °С на термомиксере (Eppendorf); стадия элюирования ДНК включала инкубацию колонки с 35 мкл буфера EB, предварительно нагретого до 37 °С, на термомиксере в течение 10 мин при 37 °С; первое центрифугирование проводили при 8000g, а последнее центрифугирование проводили в течение нескольких минут.

Для анализа последовательности мтДНК субфоссильных образцов был выбран фрагмент 490 пн в контрольном районе мтДНК. Для более эффективной амплификации была применена система амплификации коротких перекрывающихся фрагментов с вложенных праймеров. Фрагмент был разбит на 4 более коротких, наработка всех четырех фрагментов проводилась отдельно для каждого образца. Каждый из четырех фрагментов секвенировали с прямого и обратного праймера для подтверждения замен.

Постановка ПЦР и реакции секвенирования по Сэнгеру проводили в условиях аналогичных современным образцам.

2.2.9. Методы филогенетического анализа

2.2.9.1. Для контрольного района мтДНК

Выравнивание последовательности части контрольного района мтДНК (628 пн для стерляди, 655 пн для сибирского осетра, 490 пн для древних образцов и 460 пн для серебряного карася) выполняли с использованием алгоритма MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) v7.245 [141] в программном обеспечении Geneious v 10.0.9 [142]. Филогенетический анализ для близких видов был проведен с применением байесовского метода в программе MrBayes v3.2.5 [117] и метода

максимального правдоподобия в программе RAxML v8.0 [143,144]. В качестве внешней группы для стерляди был взят родственный вид – шип (*Acipenser nudiiventris*), для сибирского осетра – русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii*). Модель замен НКУ+G+I выбрана на основании АИС теста в программе jmodeltest2 [104]. В байесовском анализе были использованы 4 марковских цепи длиной 5 млн поколений. Деревья отбирались каждые 2500 итераций, а первые 25% деревьев были отброшены как нестационарные. Апостериорные вероятности были рассчитаны для консенсусного дерева, построенного по принципу простого большинства. Для метода максимального правдоподобия была использована стратегия “ML + thorough bootstrap” и модель замен GTR+G с 10 запусками по 10000 повторов. Визуализация филогенетических деревьев проведена в программе FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Используя полные последовательности контрольного района мтДНК, нам не удалось получить филогенетическое дерево с достаточной бутстрэп-поддержкой. После удаления тандемных повторов и шести гипервариабельных сайтов (было выполнено вручную в программном обеспечении Geneious), полученное филогенетическое дерево позволило нам определить кластеризацию гаплогрупп с достаточной бутстрэп-поддержкой (Табл. 2П).

Взаимоотношения между гаплотипами анализировали с помощью программного обеспечения Haplotype Viewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>), в качестве входной топологии использовалось филогенетическое дерево, построенное по методу максимального правдоподобия.

2.2.9.2. Для полных митохондриальных геномов

Сборку парных прочтений проводили на референсный митохондриальный геном стерляди (Genbank NC_022453.1) и сибирского осетра (Genbank NC_017603.1) соответственно. Выравнивание прочтений на геном проводили с использованием алгоритма BWA-MEM. Восстановление консенсусной последовательности осуществляли в программном обеспечении Geneious. Значение минимального покрытия – 3, с применением правила разрешения неопределенностей «majority rule». Прочтения, полученные для шипа, выравнивали на митохондриальный геном стерляди (Genbank NC_022453.1) как на максимально близкий вид, для которого собран референсный геном. Выравнивание последовательностей полных митохондриальных геномов проводили с использованием алгоритма MAFFT. Для определения моделей замен для

тРНК, каждого из трех кодонов генов и некодирующего контрольного района использовали программное обеспечение PartitionFinder 2.1.1 [105]. Были выбраны модели замен: НКУ, НКУ+G, НКУ+I – для тРНК; НКУ, GTR+G, НКУ+I, GTR, F81, JC – для разных позиций кодонов в разных белках; НКУ+I+G – для контрольного района. Филогенетический анализ был проведен с применением байесовского метода в программе MrBayes v3.2.5 [117]. В качестве внешней группы был взят родственный вид – шип (*Acipenser nudiiventris*), полный митохондриальный геном которого также был получен нами. В байесовском анализе были использованы 4 марковских цепи длиной 5 млн поколений. Деревья отбирались каждые 2500 итераций, а первые 25% деревьев были отброшены как нестационарные.

2.2.10. Методы популяционного анализа

Популяционный анализ проводился с использованием программных обеспечений Arlequin 3.5 [120], DnaSP 5.10 [121] и BEAST 1.8.3 [145].

Программа Arlequin была использована для расчета индексов молекулярного разнообразия и средних различий между популяциями, а также для анализа распределения генетических различий, молекулярной дисперсии, и тестов нейтральности эволюции. Для распределения генетических различий мы оценили параметры демографической экспансии с использованием попарных дистанций и 1000 повторов бутстрэпа. Для анализа молекулярной дисперсии был применен стандартный метод с 1000 перестановками для определения различий в популяциях Обь-Иртышского бассейна и Енисея, между Обью и Иртышом, а также до и после плотины ГЭС Новосибирского водохранилища. Расчет популяционных попарных различий и всех индексов молекулярного разнообразия, за исключением гаплотипического разнообразия, проводился в программном обеспечении Arlequin с параметрами по умолчанию.

Гаплотипическое разнообразие было посчитано в программном обеспечении DnaSP с параметрами по умолчанию.

Мы использовали программное обеспечение BEAST для подсчета времени расхождения между основными гаплогруппами, а также построили Bayesian Skyline Plot (Drummond et al. 2005) для реконструкции демографической истории популяции. В качестве параметров для древа были выбраны «Calibrated Yule Process» для

молекулярной датировки и «Coalescent: Bayesian Skyline» для Bayesian Skyline Plot. В обоих анализах марковские цепи были запущены на 250 миллионов поколений. Для оценки времени дивергенции между основными гаплогруппами стерляди, молекулярные часы были калиброваны на время дивергенции между стерлядью (*A. ruthenus*) и шипом (*A. nudiventris*), которое по оценкам составляет 44.5 миллионов лет (95% HPD 18.7-80.5 миллионов лет) (Peng et al. 2007). Для Bayesian Skyline Plot скорость мутаций равная $2,3 \cdot 10^{-3}$ замен на сайт за миллион лет была получена из средней оценки молекулярной датировки. Результат сходимости цепей был визуализирован в программе Tracer v1.6 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). Так же с помощью Tracer разное количество групп в анализе скайлайна (5, 10, 15, 20) и разные модели скайлайна (константная, линейная) были протестированы с использованием модельного теста, основанного на факторе Байеса (Kass and Raftery 1995). Лучшей была выбрана константная модель с 10 группами.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Структура популяции стерляди в реках северной Евразии

3.1.1. Филогения гаплотипов современной стерляди в реках Сибири

Образцы из природных популяций стерляди были собраны с обширной площади на территории Сибири, бассейнов двух рек, впадающих в Северный Ледовитый океан – Оби и Енисея (Рис. 2, Табл. 3П). А также были взяты аквакультурные образцы из рыбных хозяйств, имеющие обское, енисейское и волжское происхождение.

Были получены нуклеотидные последовательности контрольного района мтДНК 331 образца стерляди (*A. ruthenus*) и одного образца родственного вида осетровых - шипа (*A. nudiventris*). Филогенетический анализ последовательности 628 пн (15971–16590 пн на референсном митохондриальном геноме – GenBank KF153104 (включает последнюю полную копию повторенного элемента в 5'-области контрольного региона мтДНК стерляди) выявил 103 новых гаплотипа по 117 полиморфным сайтам. Все открытые гаплотипы отличаются от ранее опубликованных последовательностей полных митохондриальных геномов KF153104.1 [72] и FJ843097.1 [146], полученных из рыбных хозяйств в Китае. Кроме того, все Обские гаплотипы отличаются от ранее опубликованных последовательностей контрольного района мтДНК стерляди из Дуная [78]. Распределение мутаций в контрольном районе мтДНК стерляди показывает неравномерную скорость возникновения мутаций по последовательности, 5'-область является более консервативной.

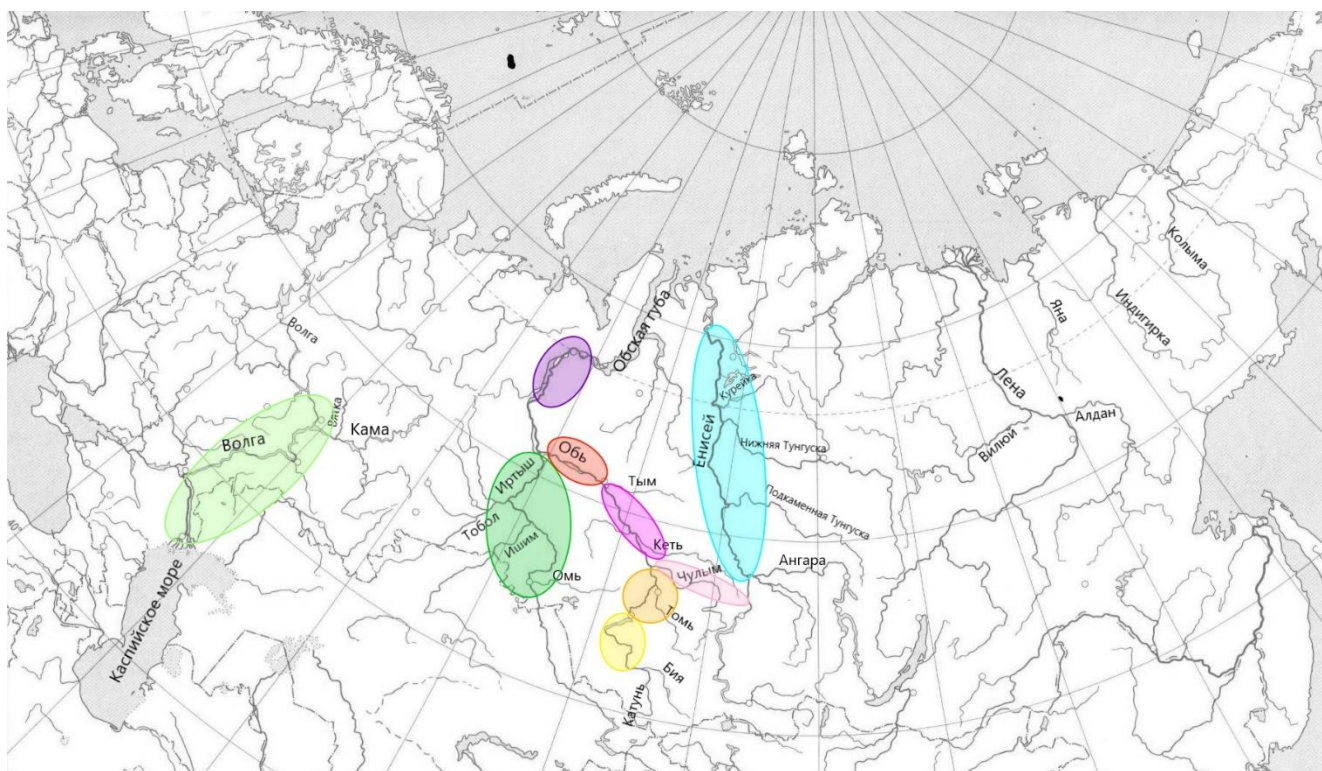


Рисунок 2. Районы сбора образцов стерляди. Цветными овалами обозначены географические регионы сбора проб.

Мы провели филогенетический анализ всех полученных гаплотипов стерляди с использованием байесовского метода и метода максимального правдоподобия, выбрав шипа *A. nudiventris*, последовательность контрольного района которого была получена нами в ходе данной работы, в качестве внешней группы (KU984331). Полученное филогенетическое древо показывает наличие двенадцати основных гаплогрупп (обозначенных А-L) (Рис. 3, Табл. 1, Табл. 4П). Гаплогруппы А-G, 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. Мы определили две отдельные клады, одна включает гаплогруппы А-Н, вторая – представлена гаплогруппами I-L. Взаимоотношения между отдельными гаплогруппами внутри данных клад остаются неразрешенными. (Рис. 3, Рис. 5). Все выявленные гаплотипы однозначно кластеризуются по гаплогруппам. Между различными гаплогруппами произошло от 6 до 40 однонуклеотидных мутаций в контрольном районе мтДНК (Рис. 4). Гаплотипическая сеть подтверждает выделение двух клад основных гаплогрупп. Наиболее широко представленной и разнообразной является гаплогруппа А, гаплогруппы F, G, J, K, L представлены единичными особями (Табл. 1, Рис. 4). Все гаплогруппы представлены в разных регионах бассейна Оби и

Енисей с разной частотой. Отдельные гаплогруппы и гаплотипы специфичны для определенных речных бассейнов (Рис. 5).

Таблица 1. Пространственное распределение полученных гаплогрупп стерляди

Гаплогруппа / Регион	Верхняя Обь А	Верхняя Обь Б	Средняя Обь А	Средний Иртыш А	Средний Иртыш Б	Нижний Иртыш А	Нижний Иртыш Б	Средняя Обь Б	Чулым + Кия	Енисей	Волга	Общее значение	Количество гаплотипов
A	7	19	6	8	1	1	17	1	10	38	0	108	47
B	2	4	4	1	0	1	3	2	3	26	0	30	16
C	2	7	3	3	2	0	7	2	7	0	1	34	8
D	2	4	0	2	0	0	1	0	7	1	0	17	3
E	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	4	8	7
F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	3	3
G	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	1
I	8	21	14	13	7	2	13	0	20	0	0	98	17
J	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
K	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
L	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2	1

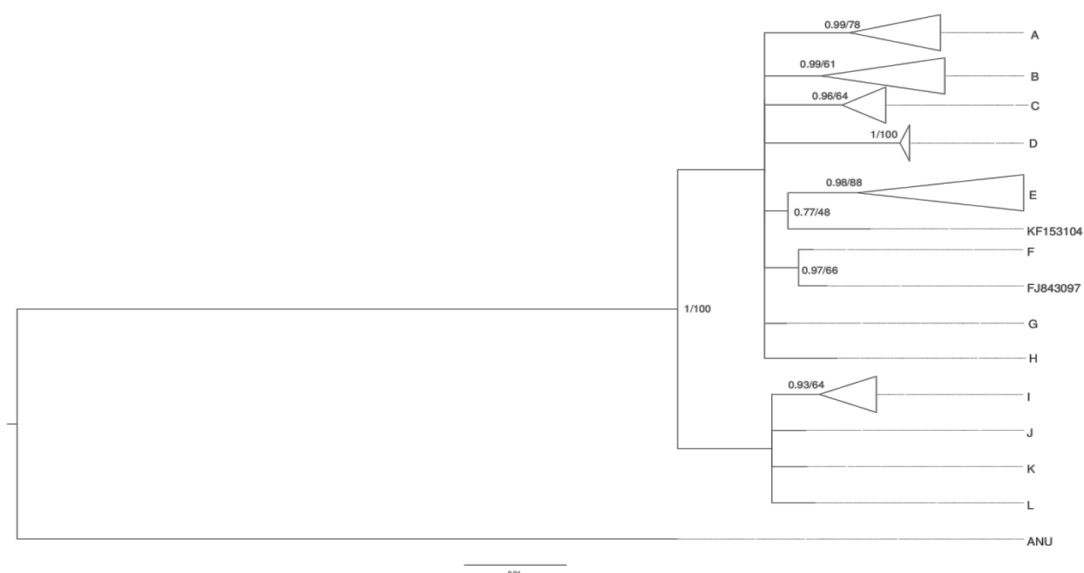


Рисунок 3. Филогенетическое древо гаплогрупп стерляди, построенное по последовательностям контрольного района мтДНК, с последовательностью контрольного района мтДНК шипа, в качестве внешней группы. Древо построено совмещением байесовского метода и методом максимального правдоподобия. Цифры над ветвями отражают Байесовские постериорные вероятности (MrBayes)/бутстреп поддержки для анализа по методу максимального правдоподобия (RaxML). A-G и I-L – основные гаплогруппы, обнаруженные в Обь-Иртышском бассейне. H – гаплогруппа стерляди из бассейна Волги. KF153104 и FJ843097 – последовательности взяты из GenBank (Li et al. 2013).

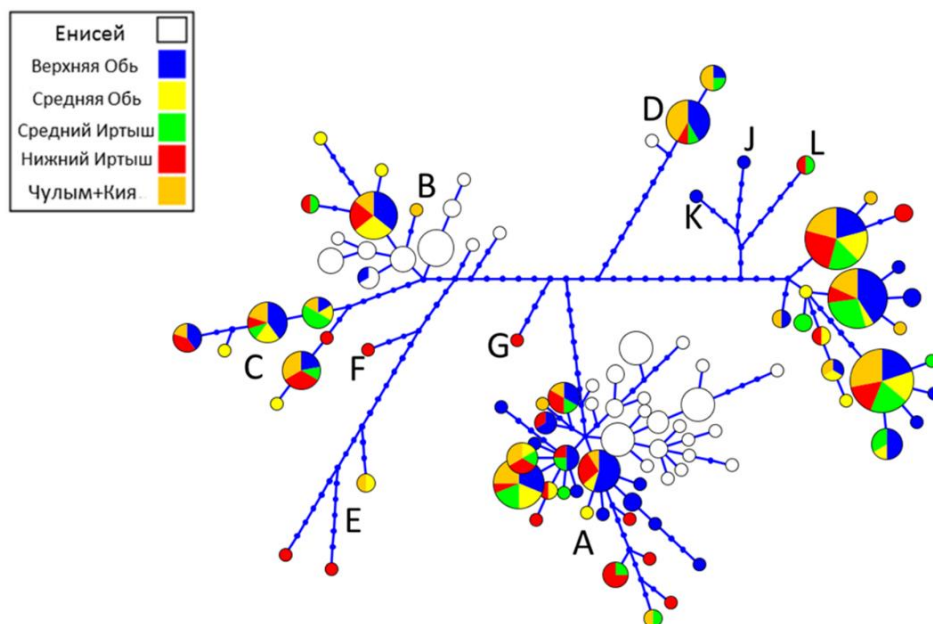


Рисунок 4. Взаимоотношения между гаплотипами стерляди в реках Сибири, полученные с использованием программы HaplotypeViewer. В качестве входной топологии использовалось филогенетическое древо, построенное по методу максимального правдоподобия. Гаплотипы описаны в таблице 4П.

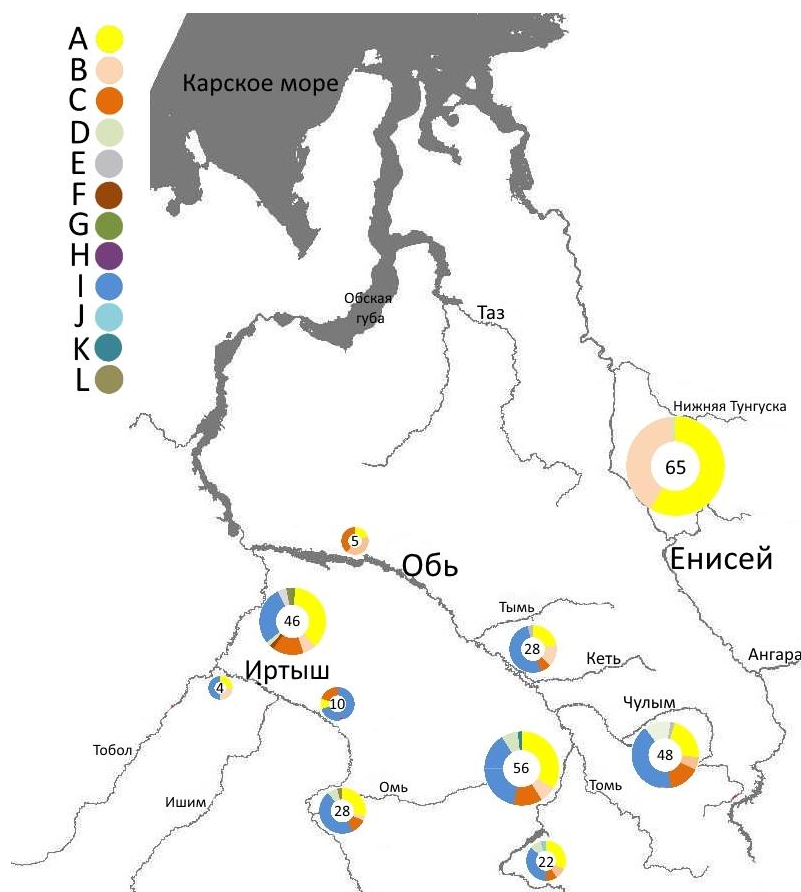


Рисунок 5. Распределение гаплогрупп стерляди в разных регионах Обь-Иртышского бассейна и бассейна Енисея. В круговых диаграммах указано количество особей, полученных из данного региона. Гаплогруппа Н была обнаружена только в бассейне Волги и отсутствует на данной схеме.

3.1.2. Филогеография гаплотипов стерляди

Нуклеотидное разнообразие (P_i) в популяции стерляди является схожим в разных регионах Обь-Иртышского бассейна, но снижено в Енисее (Табл. 2). В целом, мы наблюдаем повышенное гаплотипическое разнообразие (H) в популяции Иртыша, в том числе, там были обнаружены некоторые редкие гаплогруппы и гаплотипы (такие как, F и G). Несмотря на близкое генетическое разнообразие по всему Обь-Иртышскому бассейну, частоты уникальных и эндемичных гаплотипов различаются, их максимальное количество отмечено в популяции Верхней Оби (Табл. 1, Рис. 4).

Таблица 2. Индексы молекулярного разнообразия среди популяций стерляди в Обь-Иртышском бассейне и бассейне Енисея

Регион	Верхняя Обь А	Верхняя Обь Б	Средняя Обь А	Средний Иртыш А	Средний Иртыш Б	Нижний Иртыш Б	Чулым + Кия	Среднее для Обь-Иртышского бассейна	Енисей	Среднее значение для двух бассейнов	Стандартное отклонение
Объем выборки	22	56	28	28	10	46	48	34	65	37.90	18.735
Кол-во полиморфных сайтов	57	67	58	59	41	84	69	61.7	49	60.50	13.093
Кол-во транзаций	56	64	54	57	41	81	66	59.9	46	58.13	12.438
Кол-во трансверсий	1	3	4	2	0	3	3	2.3	3	2.38	1.302
Кол-во гаплотипов	16	26	17	17	6	27	22	18.7	32	20.38	8.123
Среднее значение попарных различий	17.99	18.41	18.22	18.98	13.07	18.72	18.60	17.71	11.29	16.66	2.973
Нуклеотидное разнообразие	0.029	0.029	0.029	0.030	0.021	0.030	0.030	0.028	0.018	0.22	0.005
Гаплотипическое разнообразие	0.970	0.958	0.950	0.955	0.867	0.966	0.947	0.947	0.946	0.95	0.033

Мы включали в анализ только те популяции, в которых объем выборки был больше 10 особей.

В Енисее были обнаружены только гаплогруппы А (в основном, подгруппа А1Е), 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. 3).

Таблица 3. Значения попарного Fst в популяциях стерляди и достоверность P-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	*

Под диагональю приведены значения индекса фиксации Fst, над диагональю (*) – наличие (+) или отсутствие (-) достоверности изоляции популяции (P-value < 0,05).

Анализ образцов из бассейна Волги показал, что 6 особей из Камы (приток Волги) принадлежат к гаплогруппе Н. Один образец относится к гаплогруппе С и имеет впервые обнаруженный нами гаплотип С1В1. Два образца, также из Камы, относятся к гаплогруппе F – гаплотипы F2 и F3 – близки к гаплотипу F1, обнаруженному в Иртыше. Шесть других образцов из этой же точки относятся к гаплогруппе Е – гаплотипы Е3А1, Е3В, Е3G близки к остальным гаплотипам группы Е из Обь-Иртышской популяции. Гаплотип Е3А, обнаруженный в Астрахани (нижнее течение Волги) является очень близким к камскому Е3В. Мы не включали данные образцы в общий анализ, так как 14 из 15 образцов получены из одного и того же региона крупного речного бассейна, что не позволило бы нам сделать достоверный вывод о разнообразии популяции бассейна Волги относительно рек Сибири.

3.1.3. Исследование субфоссильных проб стерляди и их сравнение с современной популяцией

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 (Табл. 5П).

Методом секвенирования по Сэнгеру собран фрагмент контрольного района мтДНК, в качестве референса использовалась последовательность полного митохондриального генома KF153104.1 Секвенированный участок охватывает фрагмент 489/490 пн (позиции 16089-16578 пн в мтДНК с делецией 1 пн в позиции 16404) с незначительным разрывом разной длины в области между позициями 16374-16427 пн. Номера, присвоенные GenBank для образцов субфоссильных проб, а также точные координаты разрыва приведены в таблице 6П.

Мы добавили в анализ 25 современных гаплотипов стерляди из разных речных бассейнов, чтобы сравнить древние и современные последовательности. Выборка включает все основные гаплогруппы, обнаруженные в популяциях Волги, Обь-Иртышского бассейна и Енисея.

Так как область прочтения последовательности для древних образцов короче последовательности, полученной для современных образцов, мы прежде всего проверили, какие гаплотипы могут оказаться неразличимы при исключении из анализа участка последовательности. Только отдельные гаплотипы внутри основных гаплогрупп оказались неразличимы при исключении указанного региона. При этом среди основных гаплогрупп не наблюдалось изменения кластеризации после удаления региона, отсутствующего в древних образцах. Таким образом, полученный регион подходит для дифференциации, по крайней мере, основных гаплотипов.

3.1.3.1. Исключение гипервариабельных позиций и анализ сайтов дезаминирования

При анализе последовательностей современной стерляди были отмечены шесть гипервариабельных сайтов, которые были исключены из анализа (Табл. 2П). При выравнивании последовательностей для древних образцов одна позиция (16392) попадает на делецию, и поэтому с самого начала не включалась в анализ. Четыре позиции (16330, 16339, 16465, 16520) содержат только два разных нуклеотида. Таким образом, только один отмеченный ранее сайт (16163) и один новый в положении 16190,

содержащий 3 разных нуклеотида, могут рассматриваться как гипервариабельные в текущем выравнивании.

Хорошо известно, что древняя ДНК может содержать различные модификации. Наиболее распространенным типом, наблюдаемым в данных секвенирования, является дезаминирование цитозина, приводящее к заменам C → T и G → A. Мы классифицировали возможные участки дезаминирования по трем категориям для ручной проверки наличия двух пиков в необработанных данных секвенирования по Сэнгеру. Для оценки возможных замен C → T и G → A мы следовали приведенным ниже правилам:

1. Высокий приоритет:

- C (G) присутствует по крайней мере в одном современном гаплотипе;
- T (A) присутствует не более чем в двух древних образцах (≤ 2);

2. Средний приоритет:

- C (G) присутствует по крайней мере в одном современном гаплотипе;
- T (A) присутствует более чем в двух, но не более чем в девяти древних образцах ($>2, \leq 9$);

3. Низкий приоритет:

- C (G) присутствует по крайней мере в одном современном гаплотипе;
- T (A) присутствует более чем в 9 древних образцах (> 9).

Координаты на последовательности, отобранные нами на основе проведенного анализа, представлены в Табл. 7П.

3.1.3.2. Филогения гаплотипов субфоссильных проб стерляди

Анализ современных образцов стерляди из бассейна Волги показал, что среди 15 особей обнаружено 7 гаплотипов, принадлежащих к 4 гаплогруппам. Взаимные филогенетические отношения между ранее описанными гаплотипами, современными гаплотипами стерляди из Камы (бассейн Волги) и последовательностями, полученными для древних образцов стерляди представлены на Рис. 6.

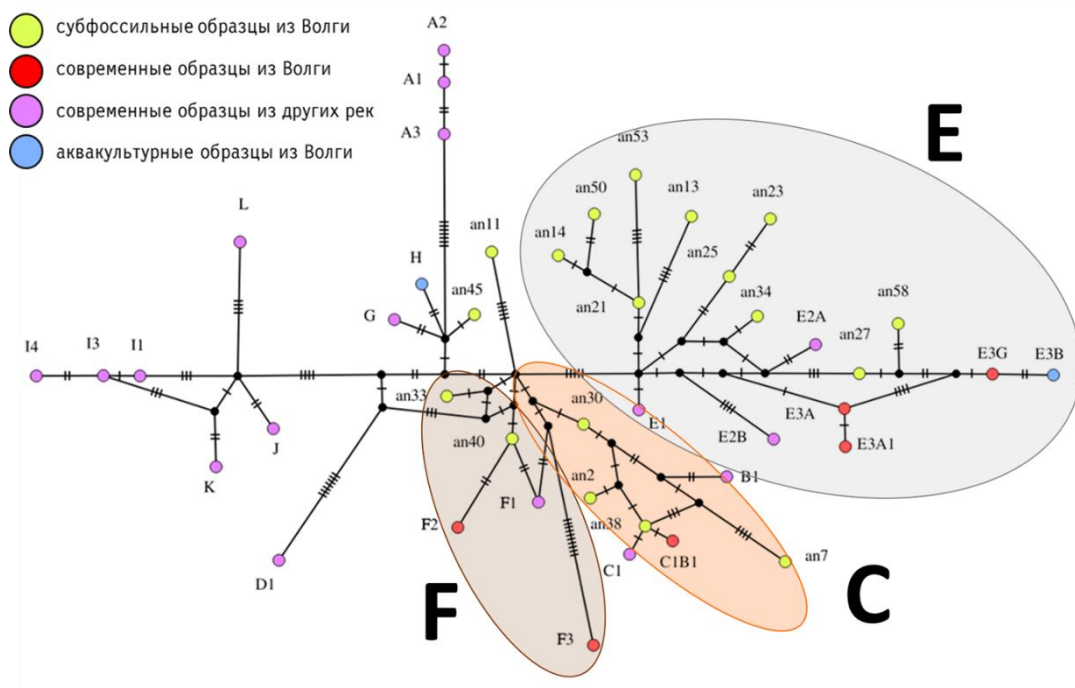


Рисунок 6. Взаимоотношения между гаплотипами субфоссильных и современных образцов стерляди. Гаплогенетическая сеть построена с использованием программы PopArt v1.7 [147]. Реконструкция взаимоотношений выполнена по алгоритму TCS [148].

Анализ показал явную кластеризацию основных гаплогрупп, она согласуется с полученными ранее данными. Мы видим, что гаплогруппы разделяются на несколько основных кластеров. Отдельную кладу составляют гаплогруппы I, J, K, L. Также выделяются ветви гаплогрупп A и D. Гаплогруппы B, C, E, F кластеризуются вместе – эти группы и ранее были описаны нами, как «общие» для разных популяций стерляди, отдельные гаплотипы были встречены только в Волжских популяциях. Образцы стерляди субфоссильных проб легли на гаплогенетической сети в узловых позициях «общих» гаплогрупп, а также расположились внутри гаплогрупп, характерных для современных волжских образцов. Мы видим их явное преобладание внутри современных гаплогрупп C, E и F.

При рассмотрении современной гаплогруппы E мы видим, что часть гаплотипов обнаружена нами в аквакультуре Астрахани и Камы и имеет волжское происхождение (E3A, E3B), гаплотипы E1, E2A, E2B встречены в Обь-Иртышском бассейне. В Енисее гаплогруппа E не обнаружена. Выявленные в аквакультуре гаплотипы стерляди близки к современным образцам из Камы (E3A1 и E3G). В гаплогруппу E кластеризуются древние образцы an21, an14, an50, an53, an13, an25, an23, an34, an27, an58.

Современную гаплогруппу F составляет гаплотип F1 встреченный нами в реке Иртыш, а также гаплотипы F2 и F3 из Камы. Близкими к ним являются древние образцы an33, an40.

Еще у одного современного образца из Камы выявлен гаплотип C1B1. Ранее образцы из гаплогруппы C были встречены нами только в Обь-Иртышском бассейне, но также в эту ветвь кластеризуются древние образцы an2, an30, an38. Образец an7 при это является более близким к гаплогруппе B, ранее описанной нами исключительно в сибирских реках, причем с явным преобладанием в более восточном Енисее.

Отдельно на гапlocети легли образцы an11 и an45. Образец an11 (возраст около 800 лет) отходит от центрального узла разделения гаплогрупп и может выступать предковым для основных гаплогрупп. Образец an45 (около 600 лет) имеет общую точку расхождения с гаплогруппами G и H - гаплогруппа H ранее была нами описана, как типичная для диких и аквакультурных образцов волжского происхождения, а гаплогруппа G – как предковая для основных гаплогрупп.

Согласно филогеографическому анализу образцы древней стерляди с разными гаплотипами близкими к современным гаплогруппам C, E и F были распространены по всему бассейну Волги равномерно. Больше всего древних образцов являются близкими к гаплогруппе E, они встречены на всем исследованном ареале. Гаплотипы, близкие к современным гаплогруппам C и F представлены меньшим количеством образцов, но также встречаются в разных частях бассейна Волги. Современные образцы взяты из одной локации, но выявляют высокое гаплотипическое разнообразие (Рис. 7).

Таким образом, мы можем говорить о выделении «восточных» гаплогрупп стерляди, которые встречаются только в Обь-Иртышском бассейне и в Енисее, «общих» гаплогрупп, гаплотипы которых встречаются на всем ареале стерляди и «западных» гаплогрупп – распространенных в западной части ареала и не встречающихся в сибирских реках.

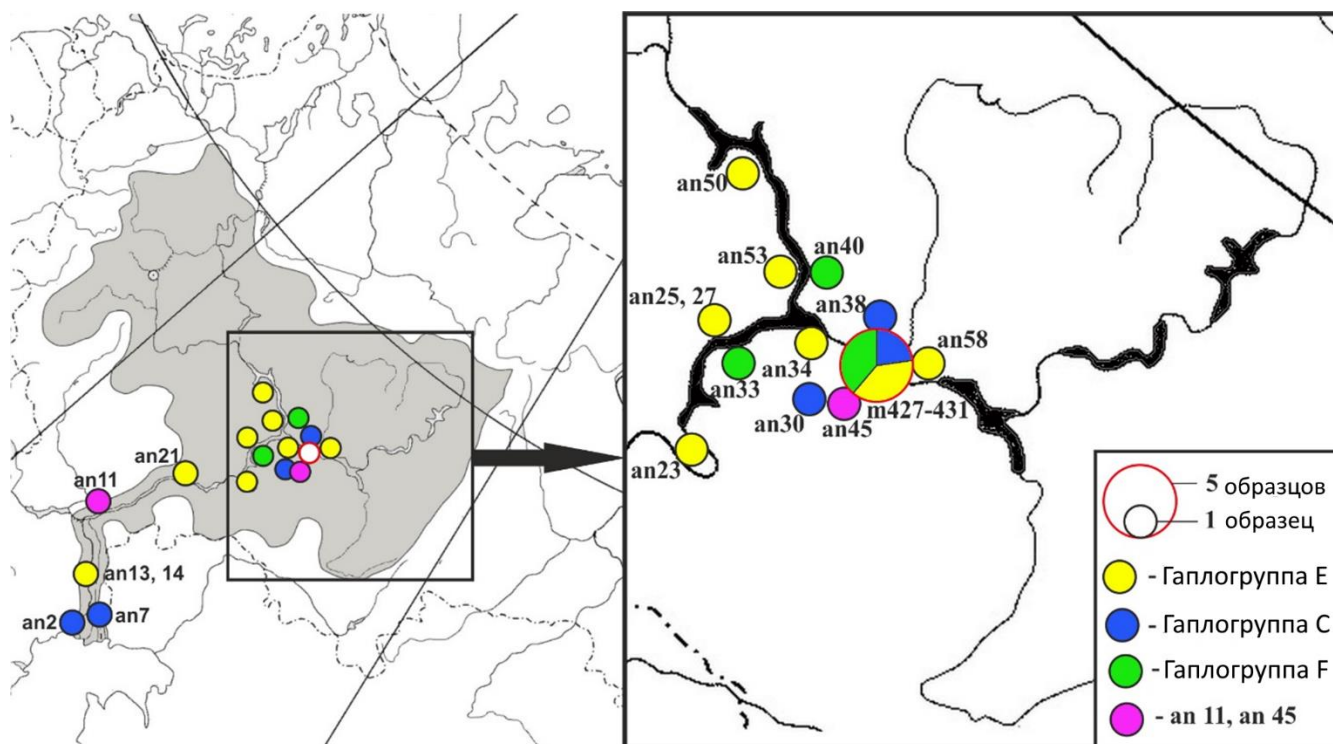


Рисунок 7. Распределение гаплогрупп субфоссильных и современных образцов стерляди в бассейне Волги.

3.1.4. Демографическая история популяции и оценка молекулярных часов

Используя время расхождения видов осетровых, рассчитанное в работе Пенга с соавторами [17], мы смогли получить оценку скорости закрепления мутаций для контрольного района мтДНК. Эта оценка составила $2,3 \times 10^{-3}$ замен на сайт на миллион лет, что почти в 50 раз медленнее, чем предсказанная ранее ($1,1-1,3 \times 10^{-1}$) в работе Брауна с соавторами [149]. Наблюдаемая скорость значительно ниже, чем скорость закрепления мутаций, рассчитанная для млекопитающих, что подтверждает хорошо описанное явление сниженной скорости молекулярной эволюции у осетровых [150,151].

Анализ молекулярной датировки показал, что расхождение двух основных клад гаплогрупп стерляди (гаплогруппы A-H и гаплогруппы I-L) произошло около 9 миллионов лет назад, а расхождение гаплогрупп внутри клад происходило между 7 и 4 миллионами лет назад. (Рис. 8), что ориентировочно соответствует времени расхождения между адриатическим осетром (*A. naccarii*) и русским осетром (*A. gueldenstaedtii*), указывая на сравнительно древний возраст вида *A. ruthenus* [17].

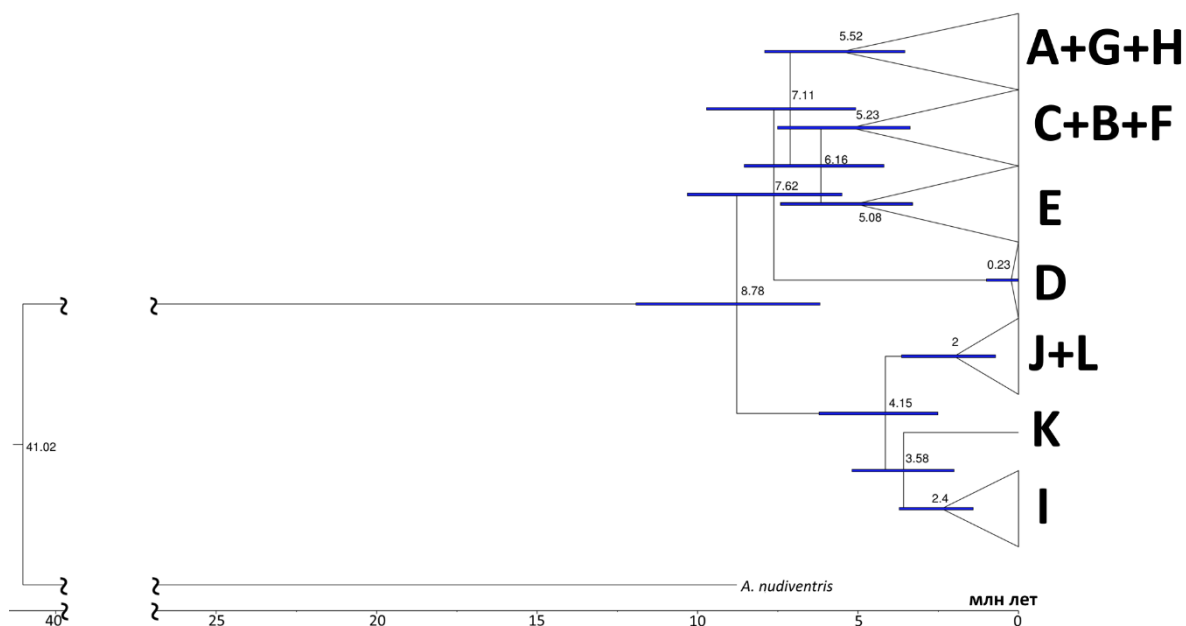


Рисунок 8. Анализ молекулярной датировки времени расхождения двух основных клад гаплогрупп стерляди.

Чтобы сделать выводы о динамике популяций Оби и Енисея, мы проанализировали распределение попарных различий (Табл. 4) в последовательностях 628 пн и построили Bayesian skyline plot для популяций Обского и Енисейского бассейнов. Анализ распределения попарных различий (Рис. 9) показал значительную экспансию популяции в Обь-Иртышском бассейне примерно 0,9–1,2 миллионов лет назад (Табл. 5). В то время как, в бассейне Енисея экспансия популяции не наблюдалась. Данные Bayesian skyline plot (Рис. 10) согласуются с результатом анализа распределения попарных различий: экспансия популяции с последующим снижением численности, начавшимся около 0,5 миллионов лет назад в Обь-Иртышском бассейне, и отсутствие снижения численности в Енисее.

Таблица 4. Среднее количество попарных различия в популяции стерляди

	Верхняя Обь А	Верхняя Обь Б	Средняя Обь А	Средний Иртыш А	Нижний Иртыш Б	Чулым + Кия	Енисей
Верхняя Обь А	17.99	17.72	17.96	18.16	18.08	17.96	17.90
Верхняя Обь Б	-0.48	18.41	18.30	18.47	18.52	18.40	18.29
Средняя Обь А	-0.14	-0.02	18.22	18.30	18.84	18.27	19.82
Средний Иртыш А	-0.32	-0.23	-0.30	18.98	19.18	18.57	20.01
Нижний Иртыш Б	-0.27	-0.04	0.37	0.34	18.72	18.93	17.24
Чулым + Кия	-0.34	-0.11	-0.14	-0.22	0.27	18.60	19.49
Енисей	3.26	3.44	5.07	4.88	2.24	4.54	11.28

Над диагональю: Среднее количество попарных различий в контрольном районе мтДНК между популяциями, в которых выборка больше 20 особей ($P_iX Y$) *По диагонали:* Среднее количество попарных различий в контрольном районе мтДНК внутри популяции (P_iX). *Под диагональю:* скорректированное среднее значение попарных различий в контрольном районе мтДНК ($(P_iX Y - (P_iX + P_iY)/2)$).

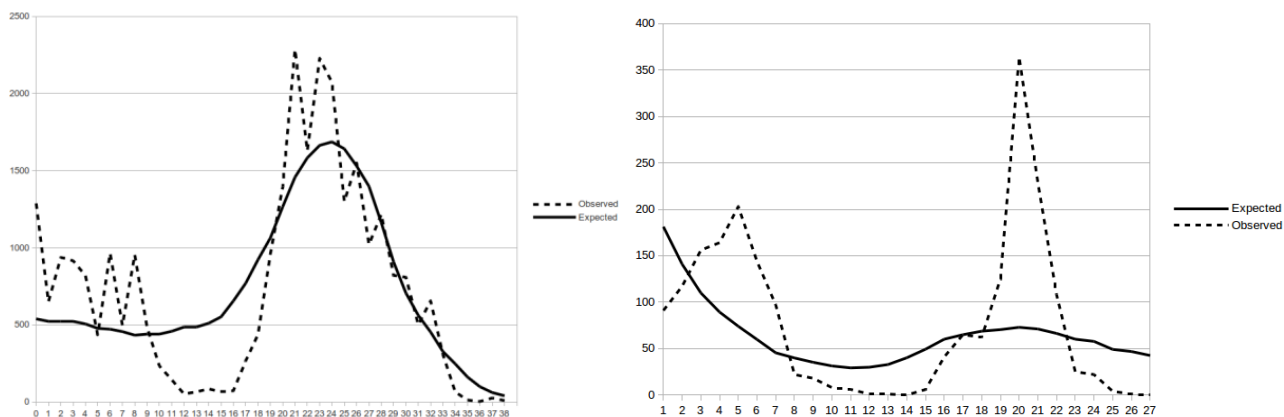


Рисунок 9. Попарное распределение несоответствий в контрольном районе мтДНК в популяциях стерляди в Оби (слева) и Енисее (справа). По оси ординат указано количество пар последовательностей контрольного района мтДНК, которые отличаются друг от друга на i сайтов, по оси абсцисс – количество попарных различий в контрольном районе мтДНК.

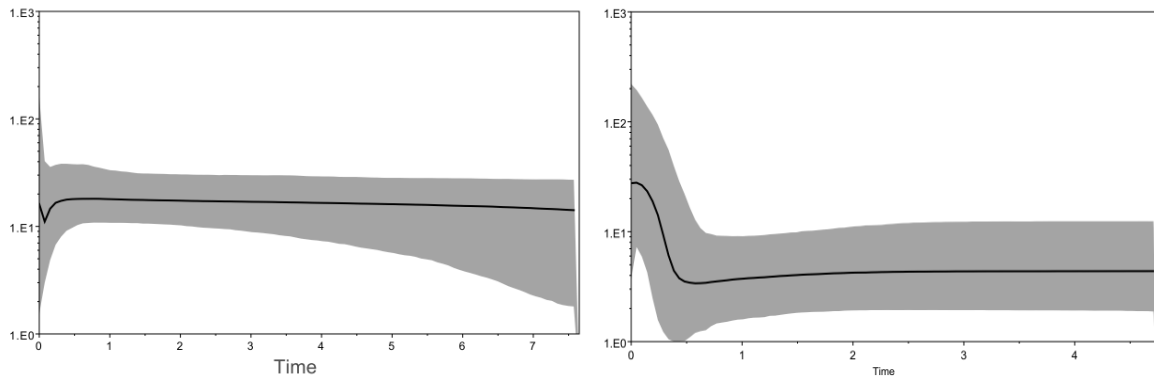


Рисунок 10. Bayesian skyline plot, отражающий динамику численности популяции стерляди в бассейне Оби (слева) и Енисея (справа). Графики построены в программе BEAST по последовательности контрольного района мтДНК. По оси ординат отложены $N_e t$ (эффективный размер популяции и время генерации в годах), по оси абсцисс – время в млн лет. Серая закрашенная область показывает доверительный интервал 95%.

Таблица 5. Анализ динамики популяции стерляди, полученный из распределения попарных различий

	τ	τ 95% HPD	t, ya	t, 95% HPD	θ	θ , 95% HPD
Обь	24,254	16,937 – 27,539	$1,2 \cdot 10^6$	$0,97 \cdot 10^6$ – $1,58 \cdot 10^6$	3,441	0,001 – 12,936
Енисей	15,710	1,593 – 36,228	$0,9 \cdot 10^6$	$0,09 \cdot 10^6$ – $2,08 \cdot 10^6$	9,097	0,299 – 16,654

Где, t - время экспансии, $\theta = 2Nu$, N - размер популяции после экспансии, u – скорость мутации на поколение на длину последовательности, $\tau = 2ut$

3.2. Структура популяции сибирского осетра в реках северной Евразии

3.2.1. Филогения гаплотипов сибирского осетра

Образцы из природных популяций сибирского осетра были собраны с обширной площади на территории Сибири, включающей бассейны трех рек, впадающих в Северный Ледовитый океан – Обь, Енисей и Лена и покрывающей большую часть ареала этого вида. В бассейнах Оби и Енисея, ареал сибирского осетра перекрывается с ареалом стерляди. Как и в случае со стерлядью, помимо природных популяций, нами были взяты образцы из рыбных хозяйств, имеющие обское и енисейское происхождение.

145 образцов сибирского осетра (*A. baerii*) были собраны в 15 точках Обь-Иртышского бассейна, 100 образцов в четырех точках бассейна Енисея, 47 образцов в шести точках в бассейне Лены (Рис. 11, Табл. 8П). Поскольку сибирский осетр, в отличие от стерляди является проходным видом и совершает протяженные миграции по рекам [6], мы не анализировали материал из каждой точки, как представляющий отдельную популяцию. Мы условно разделили Обь-Иртышский бассейн на пять районов, а бассейны Енисея и Лены рассматривали в целом, так как количество образцов, полученных из разных точек в данных бассейнах, распределено неравномерно.

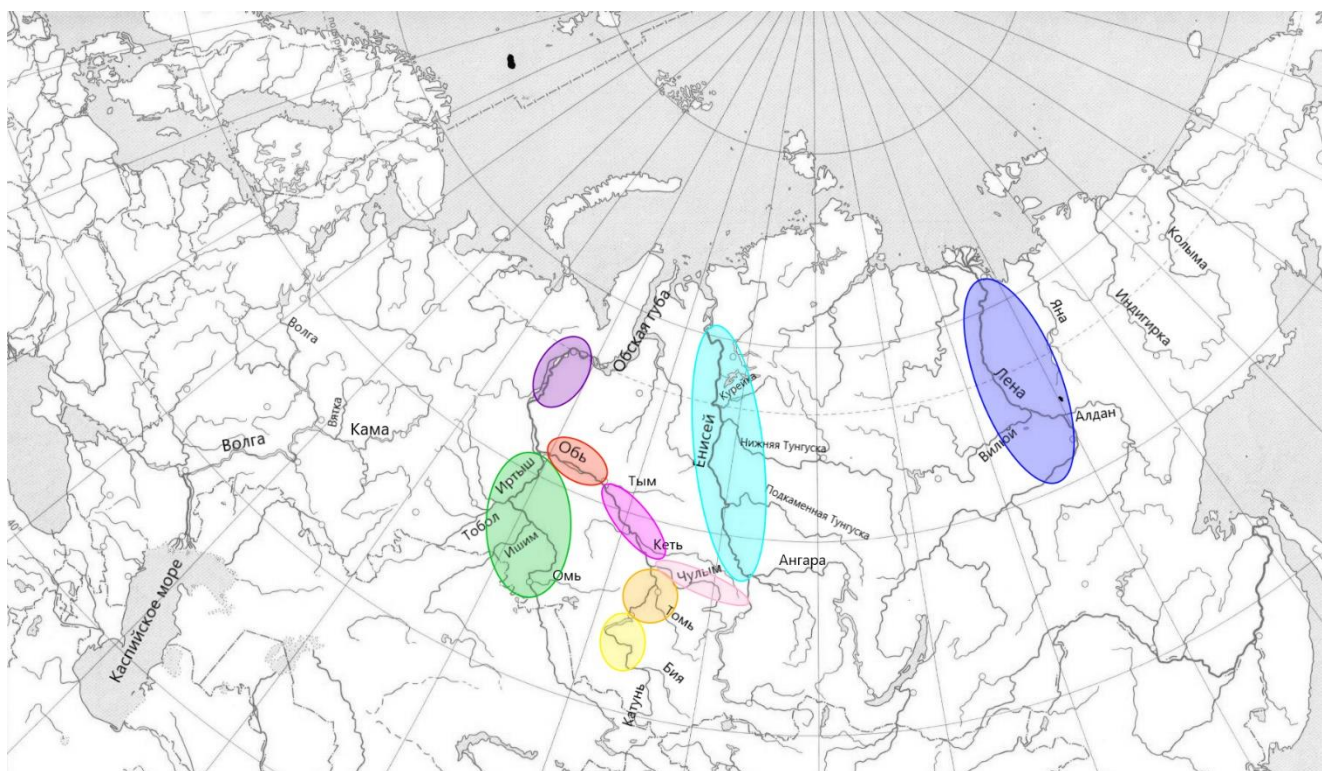


Рисунок 11. Расположение образцов сибирского осетра в Обь-Иртышском бассейне, бассейнах Енисея и Лены. Цветными овалами обозначены географические регионы сбора образцов.

Последовательности нуклеотидов контрольного района мтДНК были получены из 298 образцов сибирского осетра. Филогенетический анализ 655 пн (15942–16597 пн на референсном митохондриальном геноме – Genbank NC_017603.1, включает последнюю полную копию повторенного элемента 5'-области контрольного региона мтДНК сибирского осетра) выявил 61 гаплотипов по 68 полиморфным сайтам. Среди встреченных нами гаплотипов, последовательности восемнадцати были описаны ранее [36,76], а 43 открыты нами впервые (Табл. 9П). Аналогично проанализированным последовательностям контрольного района мтДНК стерляди, распределение мутаций в контрольном районе мтДНК сибирского осетра показывает неравномерную скорость возникновения мутаций по последовательности, а 5'-область является более консервативной.

Мы провели филогенетический анализ с применением байесовского метода для всех полученных гаплотипов сибирского осетра, и последовательности контрольного района мтДНК русского осетра (*A. gueldenstaedtii* - HQ730430.1) в качестве внешней группы. На полученном филогенетическом древе все гаплотипы сибирского осетра кластеризуются в две основные гаплогруппы (обозначенные А и В) (Рис. 12).

Гаплогруппа А распространена повсеместно, во всех исследуемых бассейнах (Рис. 13, Рис. 14), 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. Филогенетические взаимоотношения между гаплотипами внутри гаплогрупп остаются неразрешенными, отличия гаплотипов друг от друга составляет всего на 1-2 замены, что не дает возможности точно определить, какой из гаплотипов является предковым.

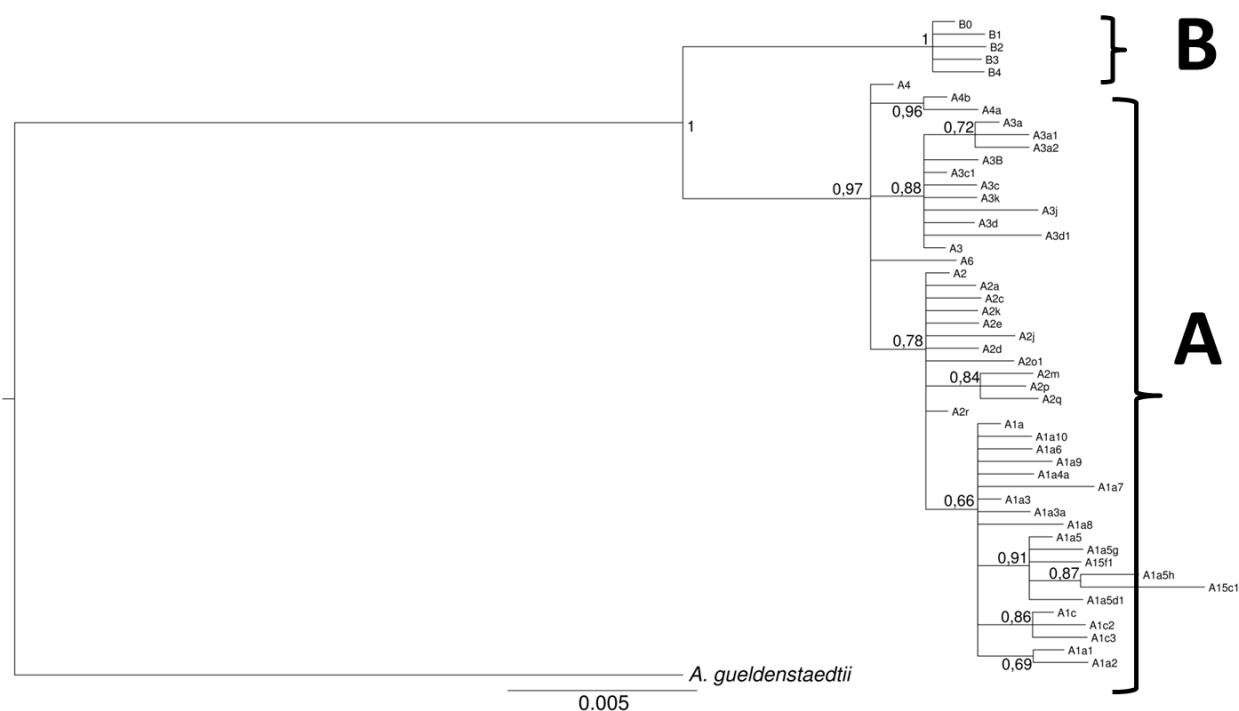


Рисунок 12. Филогенетическое древо гаплогрупп сибирского осетра, построенное по последовательностям контрольного района мтДНК, с последовательностью контрольного района мтДНК русского осетра, в качестве внешней группы. Древо построено байесовским методом. Цифры над ветвями отражают Байесовские постериорные вероятности (MrBayes). А и В – основные гаплогруппы, обнаруженные в бассейнах рек Сибири.

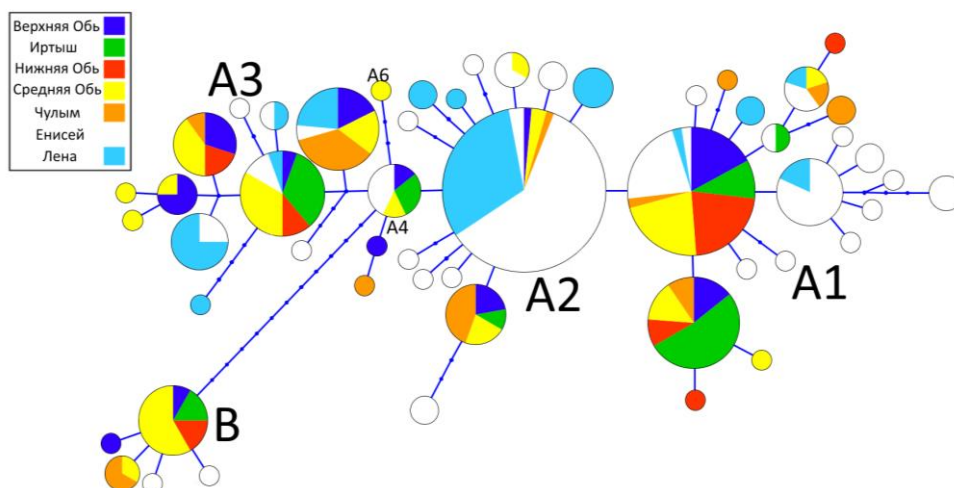


Рисунок 13. Взаимоотношения между гаплотипами сибирского осетра, полученные с использованием программы HaplotypeViewer. В качестве входной топологии использовали филогенетическое древо, построенное по методу максимального правдоподобия. Гаплотипы описаны в таблице 9П.

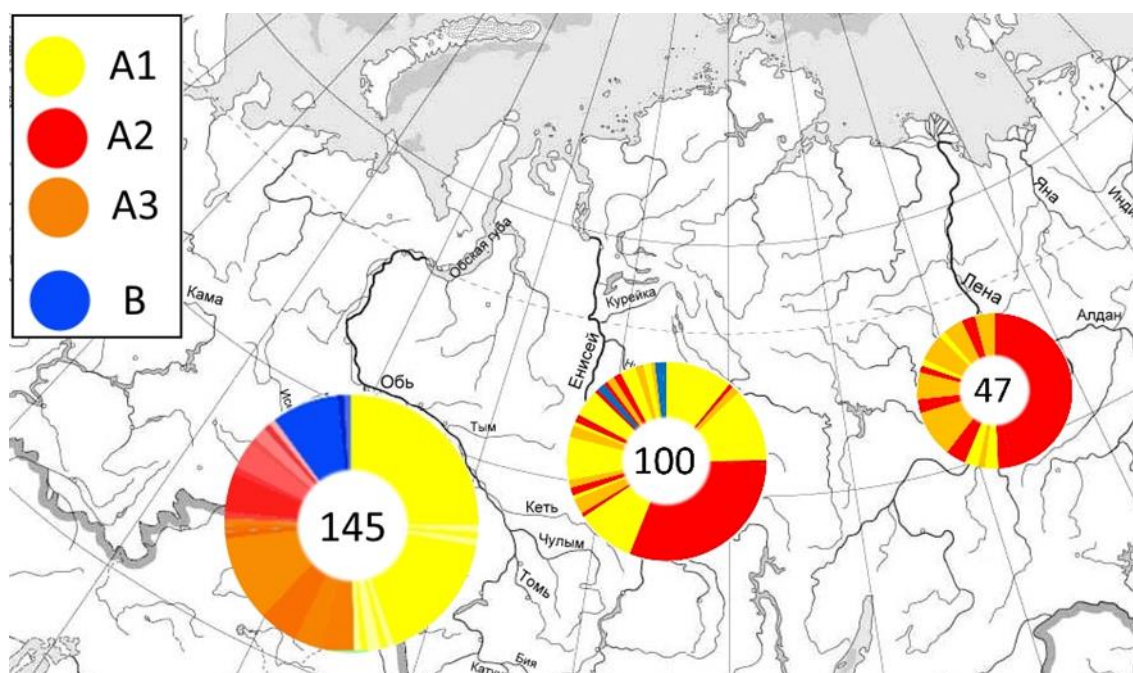


Рисунок 14. Распределение гаплогрупп сибирского осетра в речных бассейнах Оби, Енисея и Лены. В круговых диаграммах указано количество особей, полученных из данного региона. Разные оттенки цветов основных гаплогрупп (желтый – А1, красный – А2, оранжевый – А3, синий – В) отображают разные гаплотипы внутри данных гаплогрупп.

3.2.2. Филогеография гаплотипов сибирского осетра

Нуклеотидное разнообразие (P_i) в популяции сибирского осетра сходно в разных районах Обь-Иртышского бассейна, значительно снижено в Енисее и еще ниже в Лене. Для гаплотипического разнообразия (H) такой тенденции не наблюдается – его значения

близки друг к другу в разных бассейнах, а внутри Обь-Иртышского бассейна, мы видим разброс значений H между районами (Табл. 6).

Таблица 6. Индексы молекулярного разнообразия среди популяций сибирского осетра в Обь-Иртышском бассейне и бассейнах Енисея и Лены

Регион	Верхняя Обь	Средняя Обь	Нижняя Обь	Чулым	Иртыш	Среднее для Обь-Иртышского бассейна	Енисей	Лена	Среднее значение для трех бассейнов	Стандартное отклонение
Объем выборки	28	45	20	24	29	29.5	100	47	58.80	27.60
Кол-во полиморфных сайтов	27	33	24	30	21	27	49	18	31.33	10.25
Кол-во транзиций	25	29	22	27	20	24.6	41	14	26.53	8.46
Кол-во трансверсий	1	3	1	1	1	0.24	7	3	3.41	2.23
Кол-во гаплотипов	13	17	7	12	6	11	30	13	18.00	8.00
Среднее значение попарных различий	4.66	7.07	4.99	5.3	4.22	5.245	2.94	2.51	3.57	1.53
Нуклеотидное разнообразие	0.0072	0.0109	0.0078	0.0088	0.0064	0.0082	0.0047	0.0039	0.0056	0.0024
Гаплотипическое разнообразие	0.910	0.913	0.766	0.909	0.741	0.848	0.818	0.767	0.811	0.077

Енисей широко представлен гаплотипом A2 и близкими к нему уникальными гаплотипами, гаплотипом A1a и производными от него гаплотипами, также там были обнаружены два уникальных гаплотипа гаплогруппы В. Гаплотип A3, напротив, представлен в Енисее только несколькими особями (Рис. 13, 14). 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. 7).

Таблица 7. 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).

3.2.3. Демографическая история популяции и оценка молекулярных часов

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. 15).

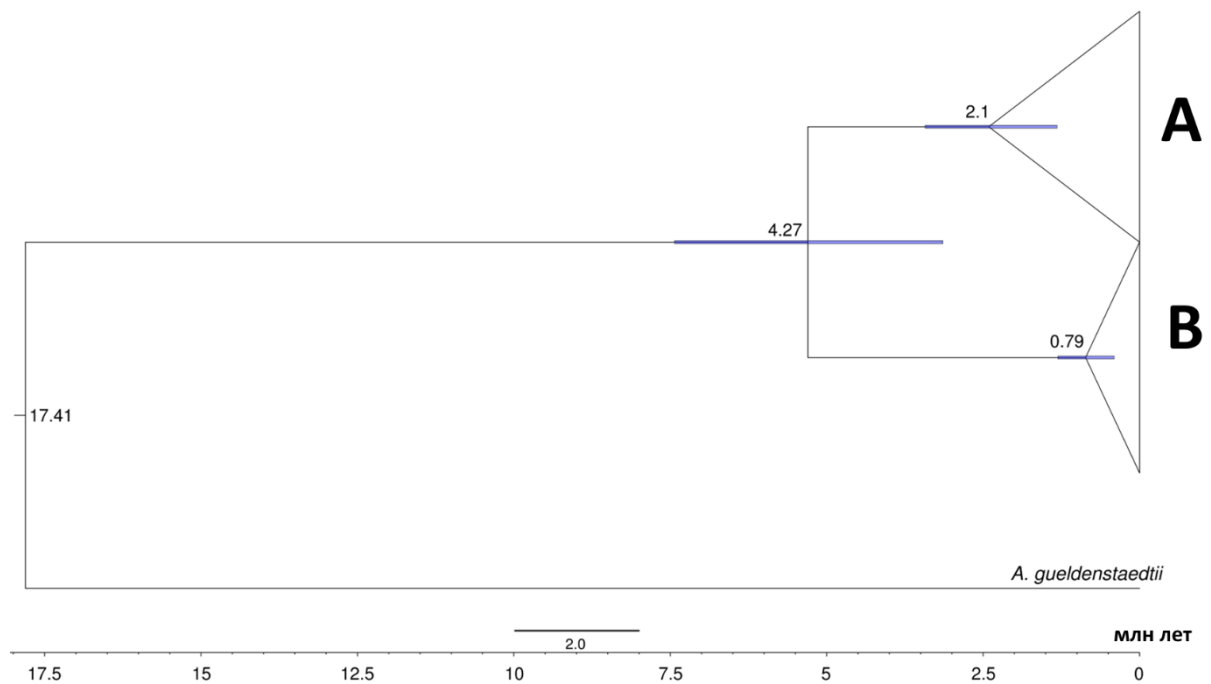


Рисунок 15. Анализ молекулярной датировки времени расхождения двух основных гаплогрупп сибирского осетра.

Для оценки динамики популяций Оби, Енисея и Лены мы провели анализ распределения попарных различий (Табл. 8) по последовательностям 655 пн и построили Bayesian skyline plot для популяций всех трех речных бассейнов. В анализе распределения попарных различий мы получили мультимодальное распределение (Рис. 16), что говорит о том, что все три популяции находятся в состоянии равновесия, когда

не происходит резкого изменения численности популяции. Такой результат может так же свидетельствовать о постепенном росте, либо постепенном снижении численности популяции (Табл. 9). Данные Bayesian skyline plot (Рис. 17) полностью согласуются с результатом анализа попарных различий только в случае Обь-Иртышского бассейна - в популяции не происходит изменения численности. В случае восточных бассейнов Енисея и Лены мы наблюдаем изменения численности популяции, происходящие в течение последних 100 тыс лет.

Таблица 8. Средние попарные различия в популяции сибирского осетра

	Нижняя Обь	Верхняя Обь	Средняя Обь	Иртыш	Чулым	Енисей	Лена
Нижняя Обь	5.09474	4.96429	6.25556	4.56207	5.51250	4.32700	4.32553
Верхняя Обь	0.05316	4.72751	5.97222	4.61700	5.13690	4.14786	3.83359
Средняя Обь	0.13041	0.03069	7.15556	5.94789	6.48148	5.73289	5.47470
Иртыш	-0.09367	0.14486	0.26174	4.21675	5.19253	4.03931	3.95671
Чулым	0.08832	-0.10366	0.02689	0.20734	5.75362	4.64583	4.35461
Енисей	0.23973	0.24420	0.61521	0.39104	0.22912	3.07980	2.97745
Лена	0.50249	0.19416	0.62126	0.57267	0.20213	0.16188	2.55134

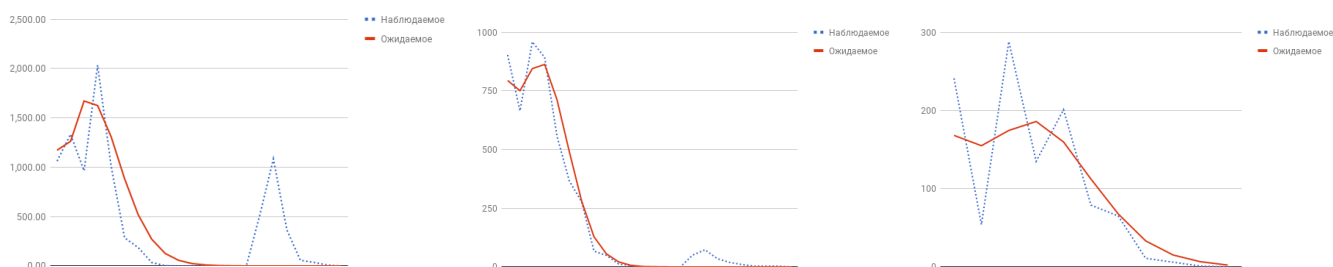


Рисунок 16. Попарное распределение несоответствий в контрольном районе мтДНК в популяциях сибирского осетра в Оби (слева), Енисее (по центру) и Лене (справа). По оси ординат указано количество пар последовательностей контрольного района мтДНК, которые отличаются друг от друга на i сайтов, по оси абсцисс – количество попарных различий в контрольном районе мтДНК.

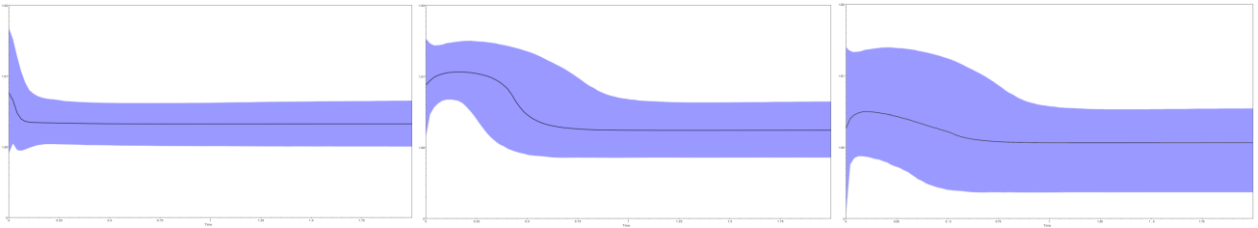


Рисунок 17. Bayesian skyline plot, отражающий динамику численности популяции сибирского осетра в бассейнах Оби (слева), Енисея (по центру) и Лены (справа). Графики построены в программе BEAST по последовательности контрольного района мтДНК. По оси ординат отложены $N_e\tau$ (эффективный размер популяции и время генерации в годах), по оси абсцисс – время в млн лет. Синяя закрашенная область показывает доверительный интервал 95%.

Таблица 9. Анализ динамики популяции сибирского осетра, полученный из распределения попарных различий

	τ	τ 95% HPD	t, ya	t, 95% HPD	θ	θ , 95% HPD
Обь	4.176	1.645 – 7.199	$1.4 \cdot 10^5$	$5.5 \cdot 10^4$ – $2.4 \cdot 10^5$	8.434	4.821 – 112.027
Енисей	3.547	1.467 – 6.578	$1.2 \cdot 10^5$	$4.9 \cdot 10^4$ – $2.2 \cdot 10^5$	5.334	2.859 – 87.835
Лена	3.730	1.590 – 7.541	$1.2 \cdot 10^5$	$5.3 \cdot 10^4$ – $2.5 \cdot 10^5$	5.439	2.728 – 96.066

t - время экспансии, $\theta = 2Nu$, N - размер популяции после экспансии, u – скорость мутации на поколение на длину последовательности

3.3. 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 – 12 гаплогрупп стерляди и две 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. 18). 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.

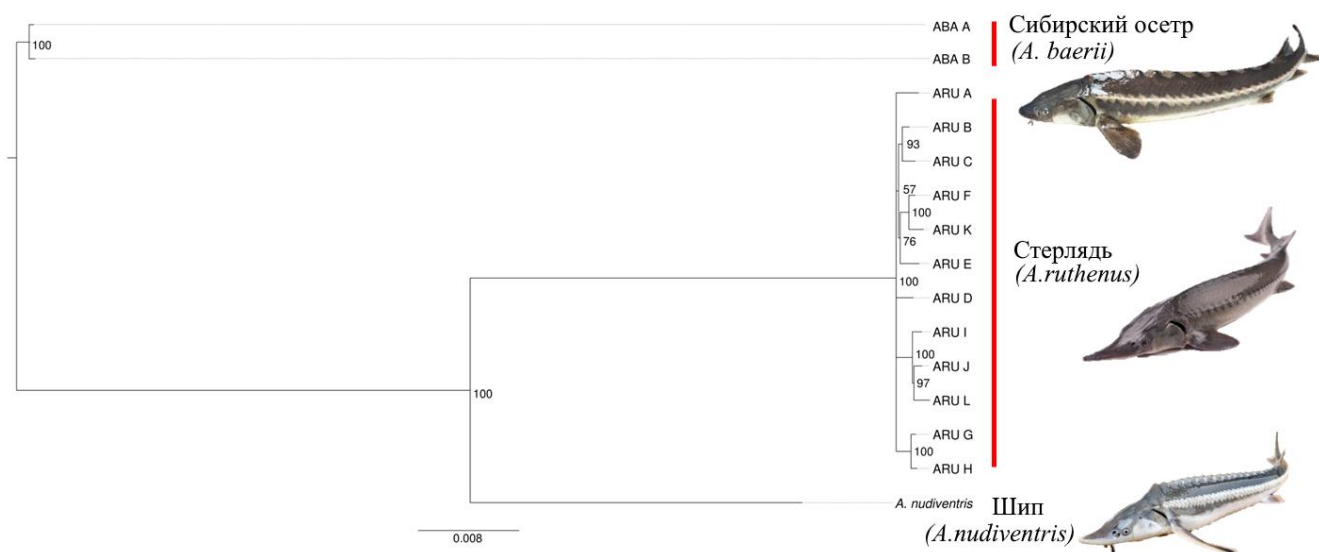


Рисунок 18. Филогенетическое древо основных гаплогрупп стерляди (*A. ruthenus*) и сибирского осетра (*A. baerii*), построенное по последовательностям полных митохондриальных геномов, в качестве внешней группы, выбран шип (*A. nudiventris*). Древо построено байесовским методом. Цифры над ветвями отражают Байесовские постериорные вероятности.

3.4. Структура популяции серебряного карася в реках северной Евразии

3.4.1. Филогения гаплотипов серебряного карася

Образцы из природных популяций серебряного карася были собраны с 4 участков Средней Оби: 2 места отлова непосредственно в р. Обь, в Парабельском и Александровском районах Томской области, на расстоянии 350 км друг от друга (7 и 14 экз., соответственно); а также из пойменных озер: оз. Монатка, расположенного в пойме р. Обь (9 экз.) и оз. Штаны в пойме р. Чулым (9 экз.). Кроме того, для анализа были использованы образцы тканей серебряного карася из Обь-Иртышского междуречья: оз. Сартлан, куда амурскую форму серебряного карася достоверно вселяли в 90-х годах XX века (12 экз.), оз. Яркуль (12 экз.), оз. Чаны (6 экз.). Мы также взяли внешнюю западную точку – оз. Костомар, в 15 км от р. Ишим (приток Иртыша), Северный Казахстан (5 экз.) (рис. 19).

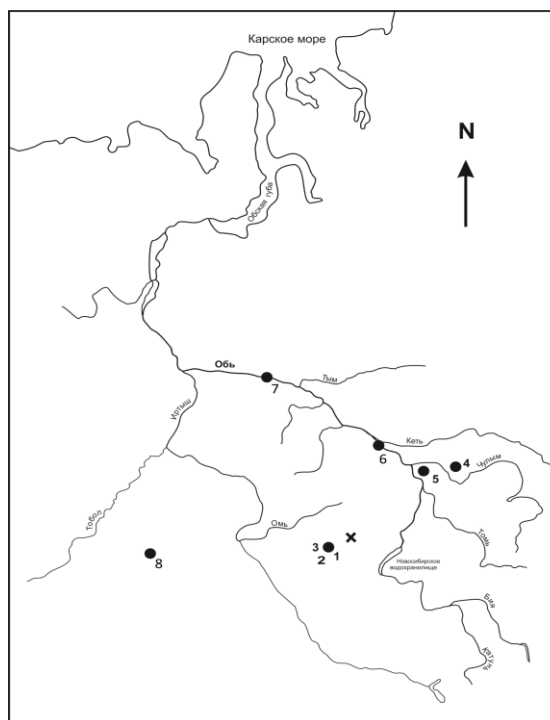


Рисунок 19. Карта-схема расположения участков отлова Серебряного карася (*Carassius gibelio*) в Западной Сибири в среднем течении р. Оби и Обь-Иртышского междуречье. 1 - Озеро Сартлан Новосибирская область; 2 - Озеро Яркуль Новосибирская область; 3 - Озеро Чаны Новосибирская область; 4 - Озеро Штаны Первомайский район Томская область; 5 - Озеро Монатка Кривошеинский район Томская область; 6 - Река Обь Парабельский район Томская область; 7 - Река Обь Александровский район Томская область; 8 - Озеро Костомар (Казахстан); X – место первого выпуска амурской формы серебряного карася в Западной Сибири.

Были получены нуклеотидные последовательности контрольного района мтДНК 83 образцов серебряного карася (*C. gibelio*). Филогенетический анализ последовательности 460 пн (15589–16017 пн на референсном митохондриальном геноме - GenBank KJ874431) выявил девять гаплотипов, принадлежащих к двум гаплогруппам. Три гаплотипа описаны и опубликованы нами впервые (Табл. 10П).

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 В филогенетически значительно отличается от гаплогруппы А (Рис. 20, Рис. 21). В работе Сакаи с соавторами [152] предполагается, что носители данного гаплотипа могут представлять особый подвид серебряного карася, хотя в работе Подлесных с соавторами [153] гаплогруппа В рассматривается как базальная подгруппа III *C. gibelio*. Распределение гаплотипов данной гаплогруппы характерно именно для северных популяций *C. gibelio*, поскольку они не отмечались в хорошо исследованных популяциях Китая и Японии.

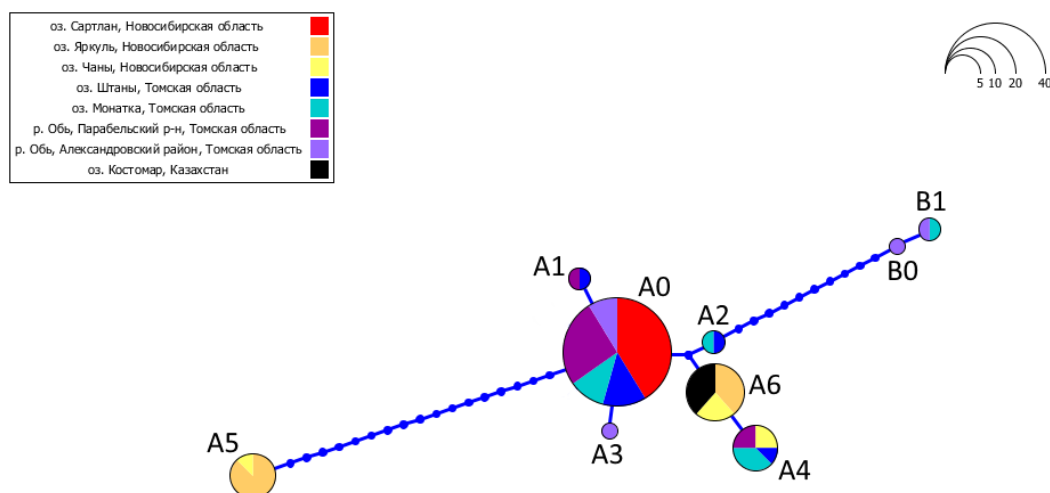


Рисунок 20. Взаимоотношения между гаплотипами серебряного карася, полученные с использованием программы HaploTYPEViewer. В качестве входной топологии использовали филогенетическое древо, построенное по методу максимального правдоподобия. Гаплотипы описаны в таблице 1. Гаплотип A5 отличается от A0 единственной делецией в 18 п.н., однако алгоритм расценивает эту мутацию как 18 однонуклеотидных замен.

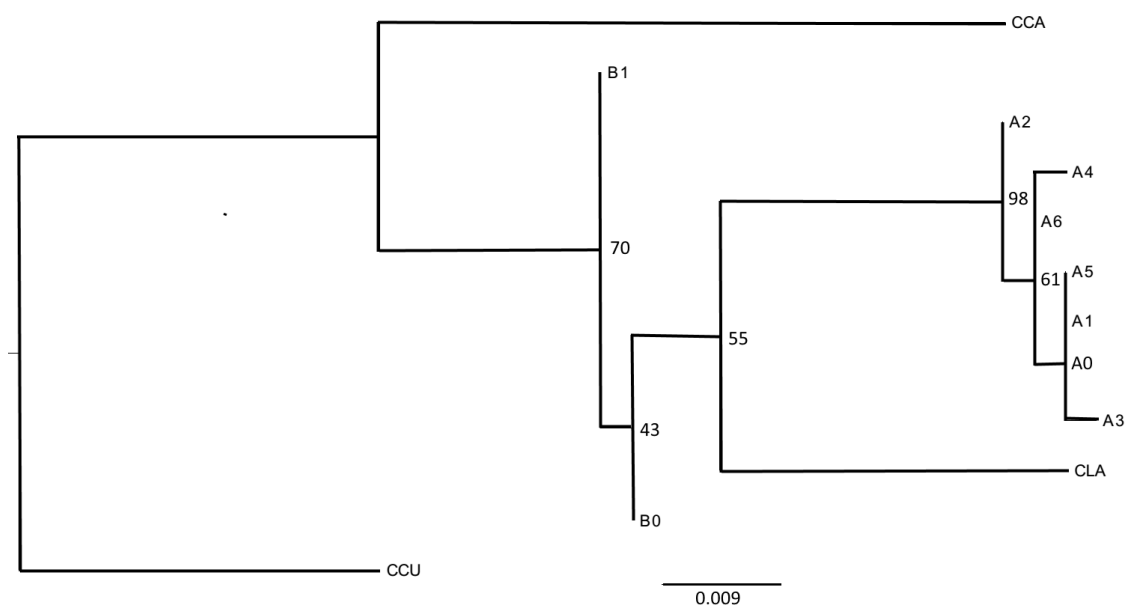


Рисунок 21. Филогенетическое дерево гаплотипов серебряного карася из Южной Сибири (A0-A6, B1, B0), построенное методом максимального правдоподобия с моделью GTR+G. CCA - последовательность золотого карася из Genbank (JQ911695.1), CCU - последовательность карася Кювье *C. cuvieri* (AP011237.1), CLA - последовательность подвида «*ginbuna*» *C. auratus langsdorfii* (DQ985007).

Наиболее высоким нуклеотидным и гаплотипическим разнообразием (Табл. 10) обладают караси самой северной выборки из р. Обь (Александровский район), а также из оз. Монатка, периодически имеющему связь с р. Обь и материковыми озерами, где, возможно, существуют рефугиумы автохтонных форм вида. Наименьшее разнообразие зарегистрировано в оз. Сартлан (Табл. 10), где, возможно, за 20 лет произошло замещение аборигенных форм серебряного карася амурским вселенцем. Хотя в близлежащих озерах Чаны и Яркуль доминируют гаплотипы A5 и A6, которые не были обнаружены в северных районах из нашей выборки. Очевидно, что на популяции серебряного карася в разных водоемах сильно повлияли процессы генетического дрейфа, эффект основателя и антропогенная интродукция.

Таблица 10. Индексы молекулярного разнообразия популяций последовательностей контрольного района мтДНК серебряного карася в изученных районах Обь-Иртышского бассейна

Популяция	Озеро Штаны	р. Обь Александровский р-он	р. Обь Парабельский р-он	Озеро Сартлан	Озеро Монатка	Оз. Чаны	Оз. Яркуль	Оз. Костомар	Всего
Кол-во экземпляров	9	7	15	19	10	6	12	5	83
Число полиморфных сайтов	3	14	2	0	14	2	1	0	14
Число гаплотипов	3	4	3	1	4	3	2	1	9
Pi	0.0019	0.015	0.0012	0	0.008	0.003	0.0013	0	0.0035
Nd	0.583	0.714	0.36	0	0.711	0.733	0.530	0	0.656

3.5.1. Филогеография гаплотипов серебряного карася

Наиболее широко распространенный, отмеченный нами во всех изученных выборках серебряного карася, гаплотип A0 был ранее описан в дальневосточных популяциях, в том числе и на Амуре [152], а также известен в бассейне Верхнего Иртыша (юго-восточная часть Казахстана) [152]. В оз. Сартлан все изученные особи содержали этот гаплотип (Рис. 22).

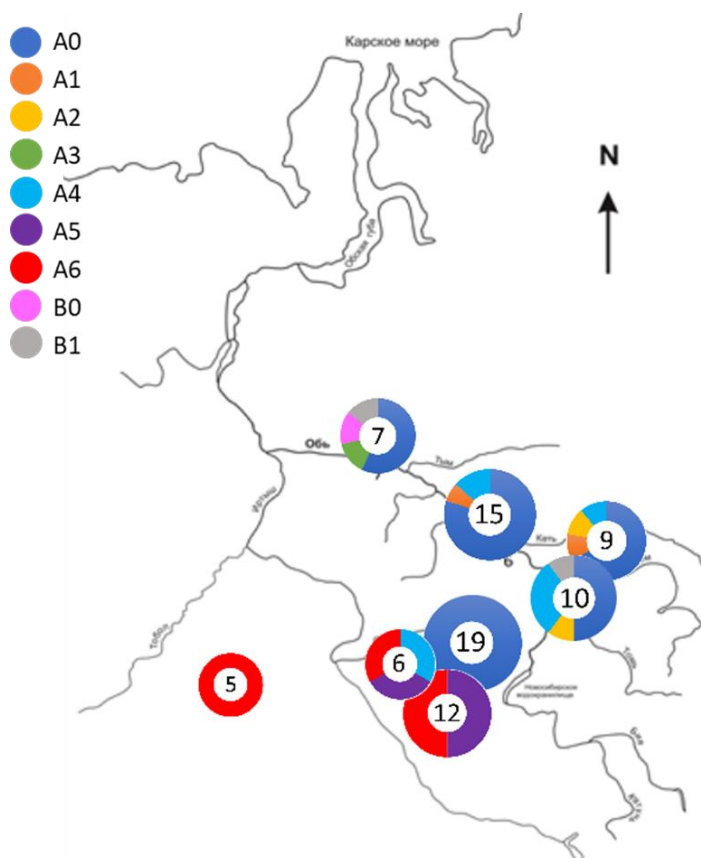


Рисунок 22. Распределение гаплогрупп серебряного карася в Обь-Иртышском бассейне. В круговых диаграммах указано количество особей, полученных из данного региона.

Гаплотип A1, ранее описанный в оз. Ханка (JN790653, JN790655), в бассейне Средней Оби малочислен, но при этом широко распространен – в наших сборах отмечен как в самой Оби, так и в пойме р. Чулым. Гаплотип A2, также известный у карасей в северо-восточной Азии и Китае (JN790652), в наших материалах встречается значительно реже и отмечен только в пойменных озерах бассейна Средней Оби. Гаплотип A3 описан нами впервые, выявлен в р. Обь (Александровский район) и незначительно отличается от гаплотипа A1 (идентификационный номер в Genbank - MF987725). Гаплотип A4 ранее был описан в оз. Ханка и Европе (JN790650, JN790655, AB080014, FJ167410.1, JN117600.1) [152]. Мы обнаружили гаплотип A5 в близко расположенных озерах Яркуль и Чаны, он отличается от других гаплотипов группы A делецией восемнадцати нуклеотидов (идентификационный номер в Genbank - MT062975), близкий к нему гаплотип описан ранее в оз. Ханка (JN790668) и центральной Европе (FJ167413). Гаплотип A6 встречается в наших выборках в озерах Яркуль, Чаны и Костомар, ранее этот гаплотип был описан в р. Чара, Казахстан (AB274415.1) [152].

Гаплотипы В0 и В1, обнаружены нами в выборке из самой северной точки сбора материала – р. Обь, Александровский район, а В0, кроме того, еще и в пойменном оз. Монатка. Эти гаплотипы относятся к гаплогруппе, описанной в Верхнем Иртыше, и, предположительно, характерной для нативной формы [152]. Интересно, что ранее в Иртыше был описан только гаплотип В0, тогда как гаплотип В1 очень похож на гаплотип В0, и отличается на одну замену нуклеотидов (идентификационный номер в Genbank - MT062976). Ранее гаплотип В0 уже был описан на о. Сахалин (GQ985474). Близкие гаплотипы были описаны в водоемах Дальнего Востока (GQ985481 (р. Камчатка), GQ985473 (р. Раздольная), JN790699 (оз. Ханка), JN790661 (оз. Ханка). В бассейне Средней Оби частота встречаемости гаплогруппы В составляет около 7 %, хотя эта цифра сильно варьирует в зависимости от района сбора и для описания распространения этой гаплогруппы необходимы дальнейшие исследования.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Молекулярно-генетическое разнообразие стерляди и сибирского осетра

Несмотря на то, что большинство видов осетровых находятся под угрозой вымирания, они остаются малоизученными с точки зрения популяционной генетики. В нашей работе мы проанализировали последовательности контрольного района мтДНК из обширной выборки стерляди (331 современный образец и 18 субфоссильных образцов) и сибирского осетра (298 образцов), полученных из крупнейших рек Сибири – Оби, Иртыша, Енисея и Лены, а также из более западного бассейна Волги, что позволило изучить структуру популяции стерляди в восточной части ареала, сибирского осетра на большей части области его распространения и провести сравнительный анализ популяций этих двух видов.

Мы показали изоляцию популяций как стерляди, так и сибирского осетра, обитающих в бассейнах разных рек Сибири (Табл. 3, Табл. 7), что выражается в резком различии в составе гаплотипов и встречаемости гаплогрупп. Это наблюдение соответствует гипотезе об изоляции популяций стерляди Дуная, Волги и Оби, высказанной на основании микросателлитного анализа [10]. Различие в гаплотипическом составе популяций позволяет предсказать, к какому речному бассейну относится образец. Например, гаплотипы стерляди, происходящие из гаплотипа A1E, широко представлены в Енисее, но отсутствуют в Оби. Обратная ситуация наблюдается для гаплогруппы I стерляди (Рис. 4, Рис. 5), около 40% популяции Обского бассейна принадлежит к этой гаплогруппе, но она абсолютно не встречается в Енисее. А гаплогруппа H не встречена нами нигде, кроме бассейна Волги.

Мы предполагали обнаружить генетическую изоляцию между популяциями стерляди разных речных бассейнов, так как этот вид крайне редко встречается в северных частях речных бассейнов, а также нетерпим к повышенной солености воды. Судходный водный канал между Обью и Енисеем, существовавший в XIX-XX веках навряд ли мог быть использован стерлядью для миграций между бассейнами из-за недостаточной глубины и высокой кислотности воды вследствие сильной заболоченности прилегающих почв. В большинстве случаев, гаплотипы стерляди являются специфичными к конкретному речному бассейну, и эта информация должна

быть учтена при проведении программ по выпуску молоди осетровых и восстановлению популяций.

Опираясь на наши данные, полученные на субфоссильных образцах стерляди и выборке из бассейна Волги, мы можем предположить, что существуют также и «общие» гаплогруппы – представители которых встречаются на всем ареале вида (Рис. 6, Рис. 7). К гаплогруппам А, D, I, J, K, L относятся 72% всех образцов из рек Сибири. 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. На гаплогруппы В, С, Е и F приходится 28% выборки, при этом все же большая часть из них принадлежит к гаплогруппам В и С, а к Е и F относятся только единичные особи (Табл. 4П), но тем не менее, мы можем придать этим гаплогруппам статус «общих», не характерных для определенной популяции. 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 с таких хозяйств, может быть приводить к распространению «западных» гаплотипов в реках Сибири.

При сравнении субфоссильных и современных образцов стерляди мы видим достаточно высокое гаплотипическое разнообразие в бассейне Волги, как среди ископаемых образцов, так и среди современных (Рис. 7). Анализ последовательностей контрольного района мтДНК субфоссильных проб показал, что исследованные образцы являются схожими с современными гаплогруппами, характерными для Волжского бассейна. Наша выборка на данный момент не позволяет сделать вывод о генетическом разнообразии современной популяции, но мы можем оценить, что гаплотипическое разнообразие стерляди в Волге сопоставимо с популяциями средних веков.

Для сибирского осетра различия в составе гаплогрупп и встречаемости гаплотипов выражены не так четко, но тем не менее можно однозначно отметить, что в гаплогруппе А гаплотипы А1а, А1с и некоторые производные гаплотипа А3 преобладают в Обь-Иртышском бассейне, гаплотип А2, как и большинство

происходящих от него гаплотипов, и гаплотипы происходящие от A1a, чаще встречаются в восточных бассейнах – Енисее и Лене. Гаплогруппа В характерна для Обь-Иртышского бассейна, из бассейна Енисея только 2 особи принадлежат к гаплогруппе В (Рис. 13, Рис. 14). По сравнению со стерлядью, в популяции сибирского осетра чаще встречаются гаплотипы, распространенные во всех трех бассейнах, такие как A1a, A1a1, A2, A3, A3c. 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.

Для обоих видов мы не обнаружили значительных различий в гаплотипическом составе между разными точками Обь-Иртышского бассейна. Анализ молекулярной дисперсии и индексы молекулярного разнообразия (Табл. 2, б) указывают на то, что и стерлядь, и сибирский осетр в Обь-Иртышском бассейне представлены едиными популяциями. Это особенно интересно, учитывая тот факт, что Новосибирское водохранилище было создано 60 лет назад, что соответствует примерно 10 поколениям стерляди или 6 поколениям сибирского осетра. Субпопуляции стерляди и сибирского осетра в Обском бассейне, разделенные плотиной Новосибирской ГЭС, различаются незначительно. На это указывают, как недостоверные значения F_{st} ($P\text{-value} > 0,05$) (Табл. 3), так и близкие значения генетического и гаплотипического разнообразия (Табл. 2). Это говорит о том, что такой период географической изоляции не является достаточным для значительных изменений в частотах встречаемости митохондриальных гаплотипов.

Некоторые популяционные исследования стерляди в Волге, проведенные с использованием как митохондриальных, так и ядерных маркеров, не выявили строгой географической структуры и популяционной дифференциации между регионами Волжского бассейна, разделенными плотинами ГЭС [8,35]. Это также подтверждается нашими данными по разнообразию и распределению гаплотипов субфоссиальной и современной стерляди.

Гаплотипическая сеть отражает, что в какой-то момент популяции стерляди в реках Сибири прошли через «бутылочное горлышко» и последующую экспансию (Рис. 4). Низкое нуклеотидное разнообразие стерляди в Енисее может говорить о серьезном «бутылочном горлышке» или «эффекте основателя» произошедшем несколько миллионов лет назад. Анализ динамики популяции подтвердил, что в течение последних 0.5–1 миллионов лет популяция стерляди Обь-Иртышского бассейна прошла через

«бутылочное горлышко» с последующим увеличением численности популяции, тогда как популяция Енисея была стабильна (Рис. 10). С другой стороны, гаплотипы стерляди, представленные в Обь-Иртышской и Енисейской популяциях, отличаются от общего предка на 1-2 мутации (Рис. 4), что соответствует примерно 1.4-2.9 миллионам лет. Рассматривая эти факты с учетом топологии филогенетического древа и гаплотипической сети, мы предполагаем, что образование гаплотипов стерляди, специфичных для отдельных бассейнов, от общего предка в гаплогруппах А и В, произошло практически сразу после разделения популяций между бассейнами.

Совсем иную картину мы наблюдаем для популяции сибирского осетра. По топологии гаплотипической сети можно сделать вывод об отсутствии резкого изменения численности популяции, например «бутылочного горлышка» или «эффекта основателя». Это подтверждается результатами анализа динамики популяции – на графиках мы не видим резкого падения численности популяции с последующей экспансией (Рис. 17). Схожие значения гаплотипического разнообразия в популяциях сибирского осетра в бассейнах рек Сибири могут свидетельствовать о том, что в Енисее и Лене мы встречаем большое количество гаплотипов, возникших недавно и отличающихся друг от друга на 1-2 мутации. В Обь-Иртышском бассейне встречается гаплогруппа В, гаплотипы которой не вносят большого вклада в гаплотипическое разнообразие, но вследствие сильной дивергенции гаплогрупп А и В, это сказывается на значениях нуклеотидного разнообразия. Высокие значения гаплотипического разнообразия при низком нуклеотидном разнообразии указывают на возможную демографическую экспансию в популяции.

Анализ молекулярных датировок времени расхождения стерляди и сибирского осетра позволил оценить время расхождения основных гаплогрупп обоих видов (Рис. 8, 13). Эти данные подтверждают гипотезу о медленной эволюции осетрообразных [16], поскольку скорость образования гаплогрупп исследуемых видов осетровых, сравнима со скоростью видообразования некоторых костистых рыб [154].

Для уточнения филогенетических взаимоотношений между основными гаплогруппами стерляди и сибирского осетра, мы получили последовательности полных митохондриальных геномов представителей каждой из гаплогрупп. По данным последовательностям мы реконструировали филогенетические взаимоотношения внутри исследуемых видов. Использование полных митохондриальных геномов позволяет

уточнить положение гаплогрупп на древе относительно друг друга, опираясь на данные не только контрольного района мтДНК, но и кодирующих районов митохондриального генома. Топология древа согласуется с гаплотипическими сетями стерляди и сибирского осетра, построенными по контрольному району мтДНК, за исключением гаплогруппы К стерляди, положение которой изменилось с клады I+J+L+K на кладу B+C+F+E+K (Рис.16).

Только два вида осетровых встречаются в Оби и Енисее – стерлядь и сибирский осетр, и только один вид – сибирский осетр – в Лене, Яне, Индигирке и Колыме, что говорит о низком видовом разнообразии, в сравнении с бассейном Волги, который представлен шестью видами осетровых [155]. Можно предположить, что популяции осетровых, населяющих реки Сибири, могли находиться под влиянием Плейстоценового оледенения, когда стоки рек были заблокированы ледниками, что вызвало изменение русла рек, формирование системы озер и их сток в Каспийский бассейн [156,157]. Проходные виды рыб пострадали от столь резких изменений в более значительной мере, чем не проходные и пресноводные оседлые виды. Вероятно, стерлядь и сибирский осетр имели выгодные адаптации, позволившие этим видам выжить в течение периода оледенения, путем ограничения путей миграции только внутри речных бассейнов.

4.2. Молекулярно-генетическое разнообразие серебряного карася

В настоящее время в озерах бассейна замкнутого стока на юге Западной Сибири наблюдается замещение аборигенной формы серебряного карася *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) вселенной в конце 70-х годов XX века в водоемы региона формой серебряного карася из р. Амур. В результате проведенного исследования в бассейне Средней Оби у серебряного карася (*C. gibelio*) выявлено девять гаплотипов, принадлежащих двум гаплогруппам (Рис. 20, Рис. 21). Серебряный карась гаплогруппы А отличается крайне низким генетическим разнообразием по сравнению с популяциями Юго-Восточной Азии [153], что свидетельствует об эффекте основателя. Наличие гаплогруппы В (Рис. 22), ранее описанной в Верхнем Иртыше и базальной для всех описанных гаплотипов [152], может указывать на сохранение автохтонных форм серебряного карася в регионе. Присутствие в большинстве выборок гаплотипа А, характерного для амурской формы серебряного карася, может свидетельствовать о

процессах замещения автохтонных форм данного вида интродуцированными амурскими формами.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полиплоидия очень часто встречается в группе лучеперых рыб. Удвоение генов и полных геномов считается важным механизмом, лежащим в основе морфологической изменчивости и функциональных инноваций в эволюции жизни [158,159], и особенно для широкого разнообразия, наблюдаемого в видообразовании рыб. Дупликация генома у рыб вероятно предоставляет генетический материал для создания различных биохимических путей. Накопление ряда новых генов может привести к более быстрому появлению новых видов [160].

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 [37], характеризуются низкой скоростью молекулярной, биохимической и морфологической эволюции [150,151,161,162]. Серебряный карась имеет формы с разным уровнем ploидности, а также образует гибриды с близкими видами, что приводит к еще более сложной идентификации статуса этого вида [58,153,163]. Все 3 изучаемых вида имеют большое значение в рыбном промысле.

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 [55].

В это же время осетровые, чья численность резко сократилась в последние десятилетия, до сих пор сохранили относительно высокое генетическое разнообразие. Мы проанализировали популяции осетровых на большей части их ареала. Результаты исследований показали, что стерлядь, с более низким уровнем ploидности, имеет более высокое генетическое разнообразие, чем сибирский осетр, у которого произошло еще одно дополнительное событие полной дупликации генома. Но это также может быть связано и с другими особенностями этих видов, в частности более коротким периодом воспроизводства у стерляди и меньшей чувствительности к антропогенному

воздействию. Наши данные хорошо согласуются с работой Барминцевой Е.А. и Мюге Н.С. [43], дополняют полученные ранее данные по западным популяциям [8] их необходимо учитывать при формировании программ по восстановлению этих видов.

Изучение субфоссильных образцов стерляди в бассейне Волги показало, что и вымершие, и современные гаплотипы относятся к гаплогруппам, описанным в Дунае и условно мы можем описать их как «западные» гаплогруппы, а также предположить, что популяции стерляди в Волге удалось сохранить высокое гаплотипическое разнообразие, несмотря на зарегулирование рек и активную хозяйственную деятельность человека [35].

Мы провели анализ митохондриального маркера, который представляет только материнские линии этих трех видов. Наши данные вносят большой вклад в описание генетической структуры популяций стерляди, сибирского осетра и серебряного карася. Описанная демографическая история видов имеет большое значение для изучения эволюции позвоночных в целом. В будущем необходимо проведение полногеномных работ по данным видам. Исследование ядерных маркеров и расширение данных об археологических образцах позволит расширить знания о состоянии и разнообразии популяций ценных промысловых видов.

6. 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, К 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 древа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pikitch E.K. et al. Status, trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries // Fish Fish. 2006. Vol 7. P. 78–79.
2. Ludwig A. A sturgeon view on conservation genetics // Eur. J. Wildl. Res. 2006. Vol. 52, № 1. P. 3–8.
3. Meirmans P.G., Liu S., Van Tienderen P.H. The Analysis of Polyploid Genetic Data // J. Hered. 2018. Vol. 109, № 3. P. 283–296.
4. Berg L.S. On the position of the Acipenseriformes in the system of fishes // Tr. Zool. Instituta. 1948. Vol. 7. P. 7–57.
5. 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. Vol. 22, № SUPPL. 1. P. 53–65.
6. Решетников Ю.С. Атлас пресноводных рыб России. Издательство “Наука”, 2002, 2002. 379 с.
7. Cheng P. et al. Draft genome and complete hox-cluster characterization of the sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) // Front. Genet. 2019. Vol. 10, № JUL. P. 1–8.
8. Reinartz R. et al. Population genetic analyses of *Acipenser ruthenus* as a prerequisite for the conservation of the uppermost Danube population // J. Appl. Ichthyol. 2011. Vol. 27, № 2. P. 477–483.
9. Dudu A. et al. Microsatellites variation in sterlet sturgeon, *Acipenser ruthenus* from the Lower Danube // Anim Sci Biotechnol. – 2013. – Т. 46. – С. 90-94.
10. Fopp-Bayat D. et al. Genetic analysis of six sterlet (*Acipenser ruthenus*) populations-recommendations for the plan of restitution in the Dniester River // Iranian Journal of Fisheries Sciences. – 2015. – Т. 14. – №. 3. – С. 634-645.
11. Рубан Г.И. Сибирский осетр *Acipenser baerii* Brandt. Москва: ГЕОС, 1999. 236 с.
12. Иоганзен Б.Г. Стерлядь бассейна р. Оби // Труды Томского университета. 1946. Вып. 97. с. 151–179.
13. Barmintseva A.E., Muge N.S. Natural genetic polymorphism and phylogeography of Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt, 1869 // Russ. J. Genet. 2017. Vol. 53, № 3. P. 358–368.
14. Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Генетический полиморфизм сибирского осетра *Acipenser baerii* Brandt, 1869 в аквакультуре // Генетика. 2018. том 54, № № 2. с. 216–223.
15. Комарова Л.В. с соавт. Полиморфизм ДНК, генетическая оригинальность и идентификация популяций и ремонтноматочных стад стерляди (*Acipenser ruthenus*) // Вестник Пермского университета, Сер. Биология. 2021. Вып. 1. с. 53–60.
16. Krieger J., Fuerst P.A. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order

- Acipenseriformes. // *Mol. Biol. Evol.* 2002. Vol. 19, № 6. P. 891–897.
17. Peng Z. et al. Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes) // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007. Vol. 42, № 3. P. 854–862.
 18. Birstein V. J., Hanner R., DeSalle R. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches, p. 127–155 // *Sturgeon Biodiversity and Conservation*, Birstein J., Waldman JR and Bemis WE (eds), Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, Netherlands. – 1997. – T. 445.
 19. Unger E. Fish tagging in fresh waters of Hungary and rubber-ring marked Danube fishes // *Verh. Int. Ver. Limnol.* 1953. Vol. 7. P. 388–397.
 20. Sallan L.C. Major issues in the origins of ray-finned fish (Actinopterygii) biodiversity // *Biol. Rev.* 2014. Vol. 89, № 4. P. 950–971.
 21. Ludwig A. et al. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus) // *Genetics*. 2001. Vol. 158, № 3. P. 1203–1215.
 22. Crow K.D. et al. An independent genome duplication inferred from Hox paralogs in the American paddlefish—a representative basal ray-finned fish and important comparative reference // *Genome Biol. Evol.* 2012. Vol. 4, № 9. P. 937–953.
 23. Fontana F., Tagliavini J., Congiu L. Sturgeon genetics and cytogenetics: Recent advancements and perspectives // *Genetica*. 2001. Vol. 111, № 1–3. P. 359–373.
 24. Zhou H. et al. Genome size variation estimated by flow cytometry in *Acipenser mikadoi*, *Huso dauricus* in relation to other species of Acipenseriformes // *J. Appl. Ichthyol.* 2011. Vol. 27, № 2. P. 484–491.
 25. Ohno S. et al. Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holosteian fishes // *Chromosoma*. 1969. Vol. 26, № 1. P. 35–40.
 26. Dong S.K. et al. Karyotype of North American shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* with the highest chromosome number in the Acipenseriformes // *Ichthyol. Res.* 2005. Vol. 52, № 1. P. 94–97.
 27. Fontana F. et al. Karyotypic characterization of *Acipenser gueldenstaedti* with c-, agn^o3, and fluorescence banding techniques // *Ital. J. Zool.* 1996. Vol. 63, № 2. P. 113–118.
 28. Dingerkus G., Howell W. Karyotypic Analysis and Evidence of Tetraploidy in the North American Paddlefish, *Polyodon Spathula* // *Science*. 1976. Vol. 19, № 194. P. 842–844.
 29. Rabosky D.L. et al. Rates of speciation and morphological evolution are correlated across the largest vertebrate radiation // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*, 2013. Vol. 4. P. 1–8.
 30. Kuhl H. et al. A 180 Myr-old female-specific genome region in sturgeon reveals the oldest known vertebrate sex determining system with undifferentiated sex chromosomes // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2021. Vol. 376, № 1832.
 31. Havelka M., Arai K. Hybridization and Polyploidization in Sturgeon // *Sex Control*

- Aquac. 2018. Vol. II. P. 669–687.
32. Keyvanshokoo S., Gharaei A. A review of sex determination and searches for sex-specific markers in sturgeon // *Aquac. Res.* 2010. Vol. 41, № 9. P. 1–7.
 33. L. Sokolov, Vasilev V. *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758 // *Freshwater Fishes Eur.* 1989. Vol. 1. P. 227–262.
 34. Sokolov L.T. On Changes in the Ranges and Population Structure of Acipenserids in Southern Seas of the USSR // *Biol. Found. Dev. Sturgeon Husb. Water Bodies USSR.* 1979. P. 209–216.
 35. Kalmykov V.A., Ruban G.I., Pavlov D.S. On the Populational Structure of Sterlet *Acipenser ruthenus* (Acipenseridae) from the Volga Lower Reaches // *J. Ichthyol.* 2010. Vol. 50, № 1. P. 44–51.
 36. Doukakis P. et al. Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species, *Acipenser baerii* and *A. stellatus*. // *Mol. Ecol.* 1999. Vol. 8. P. S117–S127.
 37. Du K. et al. The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization // *Nat. Ecol. Evol.* Springer US, 2020. Vol. 4, № 6. P. 841–852.
 38. Andreyushkova D.A. et al. Next generation sequencing of chromosome-specific libraries sheds light on genome evolution in paleotetraploid sterlet (*Acipenser ruthenus*) // *Genes (Basel).* 2017. Vol. 8, № 11. P. 1–12.
 39. Trifonov V.A. et al. Evolutionary plasticity of acipenseriform genomes // *Chromosoma.* Chromosoma, 2016. Vol. 125, № 4. P. 661–668.
 40. Brandt J.F. Einige Worte über die europaisch-asiatischen Storarten (Sturionides), von Johann Friedrich Brandt // *Bull. L'Academie Imp. Sci.* 1870. Vol. V. 14. P. 171–175.
 41. Никольский А.М. Гады и рыбы. Брокгауз–Е. Петроград, 1902. 872 с.
 42. Ruban G.I. Species structure, contemporary distribution and status of the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* // *Env. Biol. Fish.* 1997. Vol. № 48. P. 221–230.
 43. Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Природный генетический полиморфизм и филогеография сибирского осетра Brandt, 1869, “Генетика” // *Генетика.* 2017. № 3. с. 345–355.
 44. Biltueva L.S. et al. Chromosome distribution of highly conserved tandemly arranged repetitive dnas in the siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) // *Genes (Basel).* 2020. Vol. 11, № 11. P. 1–18.
 45. Попов П.А. Рыбы Сибири: распространение, экология, вылов. Новосибирск: Новосибирский государственный университет, 2007. 526 с.
 46. Fan Z., Liu G. The ploidy and reproductive mechanism of crucian carp, *Carassius auratus gibelio* // *J. Fish Biol.* 1990. Vol. 36, № 3. P. 415–419.
 47. Апаликова О.В. Филогеография пloidности и митохондриальной ДНК у

- серебряного карася *Carassius auratus gibelio* в популяциях Евразии // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. 2008. Вып. 4. с. 389–397.
48. Li X.Y. et al. Evolutionary history of two divergent *Dmrt1* genes reveals two rounds of polyploidy origins in gibel carp // *Mol. Phylogenet. Evol.* Elsevier Inc., 2014. Vol. 78, № 1. P. 96–104.
 49. Li X.Y. et al. Extra microchromosomes play male determination role in polyploid gibel carp // *Genetics*. 2016. Vol. 203, № 3. P. 1415–1424.
 50. Zhu H.P., Ma D.M., Gui J.F. Triploid origin of the gibel carp as revealed by 5S rDNA localization and chromosome painting // *Chromosom. Res.* 2006. Vol. 14, № 7. P. 767–776.
 51. Vetešník L. et al. Morphometric and genetic analysis of *Carassius auratus* complex from an artificial wetland in Morava River floodplain, Czech Republic // *Fish. Sci.* 2007. Vol. 73, № 4. P. 817–822.
 52. Lusková V. et al. *Carassius auratus gibelio*—The most successful invasive fish in waters of the Czech Republic // *Russ. J. Biol. Invasions*. 2010. Vol. 1, № 3. P. 176–180.
 53. Hänfling B. et al. A molecular approach to detect hybridisation between crucian carp (*Carassius carassius*) and non-indigenous carp species (*Carassius* spp. and *Cyprinus carpio*) // *Freshw. Biol.* 2005. Vol. 50, № 3. P. 403–417.
 54. Иоганзен Б.Г. Зональное и биотопическое распределение рыб в долине Оби // Биологические ресурсы поймы Оби. Новосибирск, 1972. с. 270–291.
 55. Interesova E.A. Alien fish species in the Ob River basin // *Russ. J. Biol. Invasions*. 2016. Vol. 7, № 2. P. 156–167.
 56. Попов П.А., Воскобойников В.А., Щенев В.А. Рыбы озера Чаны // Сибирский Экологический журнал. 2005. Т. 12, № № 2. с. 279–293.
 57. Yadrenkina E.N. Distribution of alien fish species in lakes within the temperate climatic zone of Western Siberia // *Russ. J. Biol. Invasions*. 2012. Vol. 3, № 2. P. 145–157.
 58. Монахов С.П. с соавт. Прошлое и настоящее видов рода *Carassius* средневожского региона. Вопросы рыболовства. 2020. Том 21. №1. с. 5–19.
 59. Lande R. Genetics and demography in biological conservation // *Science*. 1988. Vol. 241, № 4872. P. 1455–1460.
 60. Templeton A.R. The Theory of speciation via the founder principle // *Genetics*. 1980. Vol. 94, № 4. P. 1011–1038.
 61. Joly E. The existence of species rests on a metastable equilibrium between inbreeding and outbreeding. An essay on the close relationship between speciation, inbreeding and recessive mutations // *Biol. Direct*. 2011. Vol. 6. P. 1–55.
 62. Кайданов Л.З. Генетика популяций. Москва: Высшая школа, 1996. 320 с.
 63. Ramsey J., Schemske D.W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in

- flowering plants // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1998. Vol. 29. P. 467–501.
64. Haldane J. Theoretical genetics of autopolyploids // *J. Genet.* 1930. Vol. 22. P. 359–372.
 65. Nei M. *Molecular evolutionary genetics.* New York: Columbia University press, 1987.
 66. Holsinger K.E., Weir B.S. Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting FST // *Nat. Rev. Genet.* 2009. Vol. 10, № 9. P. 639–650.
 67. Dufresne F. et al. Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: An overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools // *Mol. Ecol.* 2014. Vol. 23, № 1. P. 40–69.
 68. Meirmans P.G. Seven common mistakes in population genetics and how to avoid them // *Mol. Ecol.* 2015. Vol. 24, № 13. P. 3223–3231.
 69. Hoban S., Bertorelle G., Gaggiotti O.E. Computer simulations: Tools for population and evolutionary genetics // *Nat. Rev. Genet.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 13, № 2. P. 110–122.
 70. Jighly A. et al. Insights into population genetics and evolution of polyploids and their ancestors // *Mol. Ecol. Resour.* 2018. Vol. 18, № 5. P. 1157–1172.
 71. Khudiy O. et al. Characterization of growth and biochemical composition of sterlet, *Acipenser ruthenus* L., juveniles from the Dniester population reared in RAS // *Arch. Polish Fish.* 2014. Vol. 22, № 4. P. 249–256.
 72. Li C. et al. Complete mitochondrial genome of sterlet (*Acipenser ruthenus*) // *Mitochondrial DNA.* 2013. Vol. 1736. P. 1–2.
 73. Tsyplakov E.P. Migrations and Distribution of Sterlet *Acipenser ruthenus* L. in the Kuibyshev Reservoir // *Vopr. Ikhtiol.* 1978. Vol. 18 (6). P. 1020–1028.
 74. Havelka M. et al. Fertility of a spontaneous hexaploid male Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* // *BMC Genet.* 2014. Vol. 15.
 75. Fopp-Bayat D., Luczynski M. Microsatellite DNA polymorphism in sturgeon species and their hybrids reared in Polish aquaculture farms // *Environ. Biotechnol.* 2006. Vol. 2, № 1. P. 11–19.
 76. Birstein V.J. et al. Testing taxonomic boundaries and the limit of DNA barcoding in the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* // *Mitochondrial DNA.* 2009. Vol. 20, № 5–6. P. 110–118.
 77. Havelka M. et al. Sturgeon genetics and cytogenetics: A review related to ploidy levels and interspecific hybridization // *Folia Zool.* 2011. Vol. 60, № 2. P. 93–103.
 78. Ludwig A. et al. First evidence of hybridization between endangered sterlets (*Acipenser ruthenus*) and exotic Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) in the Danube River // *Biol. Invasions.* 2009. Vol. 11, № 3. P. 753–760.
 79. Vasil'ev V.P. et al. Fertility of females of sturgeon hybrids obtained from species with different levels of ploidy (*Acipenser ruthenus* and *A. dauricus*) and their cloning // *J.*

- Appl. Ichthyol. 2021. Vol. 37, № 2. P. 186–197.
80. Polyanovsky V.O., Roytberg M.A., Tumanyan V.G. Comparative analysis of the quality of a global algorithm and a local algorithm for alignment of two sequences // *Algorithms Mol. Biol.* 2011. Vol. 6, № 1. P. 1–12.
 81. David W. Mount. *Bioinformatics, Sequence and Genome Analysis* // *J. Chem. Inf. Model.* 2013. Vol. 53, № 9. P. 1689–1699.
 82. Feng D.F., Doolittle R.F. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. // *J. Mol. Evol.* 1987. Vol. 25, № 4. P. 351–360.
 83. Higgins D.G., Sharp P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. 1988. Vol. 73. P. 237–244.
 84. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* 1994. Vol. 22, № 22. P. 4673–4680.
 85. Notredame C., Higgins D.G., Heringa J. T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 302, № 1. P. 205–217.
 86. Gotoh O. Significant improvement in accuracy of multiple protein sequence alignments by iterative refinement as assessed by reference to structural alignments // *J. Mol. Biol.* 1996. Vol. 264, № 4. P. 823–838.
 87. Brudno M. et al. Fast and sensitive multiple alignment of large genomic sequences // *BMC Bioinformatics.* 2003. Vol. 4, № 1. P. 66.
 88. Edgar R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 5. P. 1792–1797.
 89. Katoh K. et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. // *Nucleic Acids Res.* 2002. Vol. 30, № 14. P. 3059–3066.
 90. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. Москва. БИНОМ, 2009. 256 с.
 91. Liò P., Goldman N. Models of molecular evolution and phylogeny. // *Genome Res.* 1998. Vol. 8, № 12. P. 1233–1244.
 92. Tavaré S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences // *American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences.* 1986. Vol. 17. P. 57–86.
 93. Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of protein molecules // *Mamm. Protein Metab.* 1969. P. 21–123.
 94. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. Vol. 16, № 2. P. 111–120.

95. Tajima F., Nei M. Estimation of Evolutionary Distance between nucleotide sequences. 1984. P. 269–285.
96. Hasegawa M., Kishino H., Yano T. aki. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // *J. Mol. Evol.* 1985. Vol. 22, № 2. P. 160–174.
97. Lanave C. et al. A new method for calculating evolutionary substitution rates. // *J. Mol. Evol.* 1984. Vol. 20, № 1. P. 86–93.
98. Tavaré S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences // *American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences.* 1986. Vol. 17. P. 57–86.
99. Rodriguez F. et al. The General Stochastic Model o f Nucleotide Substitution The G4H Model // *DNA Seq.* 1990. Vol. 0. P. 485–501.
100. Uzzell T., Corbin K. Fitting Discrete Probability Distributions to Evolutionary Events // *Science (80- .)*. 1971. Vol. 172, № 3988. P. 1089–1096.
101. Jin L., Nei M. Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis. // *Mol. Biol. Evol.* 1990. Vol. 7, № 1. P. 82–102.
102. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Mol Biol Evol.* 1993. Vol. 10, № 3. P. 512–526.
103. Wakeley J. Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA // *J. Mol. Evol.* 1993. Vol. 37, № 6. P. 613–623.
104. Darriba D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // *Nat. Methods. Nature Publishing Group*, 2012. Vol. 9, № 8. P. 772–772.
105. Lanfear R. et al. Partitionfinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses // *Mol. Biol. Evol.* 2017. Vol. 34, № 3. P. 772–773.
106. Hall B.G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA // *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol. 30, № 5. P. 1229–1235.
107. Sokal R.R., Michener C.D. A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships // *The University of Kansas Science Bulletin.* 1958. Vol. 38, № February. 1409–1438 p.
108. Hecht M., Goody P., Hecht B. Major patterns in vertebrate evolution // *The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference.* 1976. Vol. 1. 1689–1699 p.
109. Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W.F. Phylogenetic Analysis Models and Estimation Procedures // *Am. J. Hum. Genet.* 1967. Vol. 19, № 3 Pt 1. P. 233–257.
110. Rzhetsky a, Nei M. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. // *Mol. Biol. Evol.* 1993. Vol. 10, № 5. P. 1073–1095.
111. Saitou N., Imanishi T. Relative Efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum-

- Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution, and Neighbor-joining Methods of Phylogenetic Tree Construction in Obtaining the Correct Tree // *Mol. Biol. Evol.* 1989. Vol. 6, № May.
112. Saitou N., Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol Biol Evo.* 1987. Vol. 4, № 4. P. 406–425.
 113. Kuhner M.K., Felsenstein J. A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. // *Mol. Biol. Evol.* 1994.
 114. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach // *J. Mol. Evol.* 1981. Vol. 17, № 6. P. 368–376.
 115. Felsenstein J. Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. // *Am. J. Hum. Genet.* 1973. Vol. 25, № 5. P. 471–492.
 116. Metropolis N. et al. Equation of state calculations by fast computing machines // *J. Chem. Phys.* 1953. Vol. 21, № 6. P. 1087–1092.
 117. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics.* 2003. Vol. 19, № 12. P. 1572–1574.
 118. Suzuki Y., Glazko G. V., Nei M. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99, № 25. P. 16138–16143.
 119. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap // *Evolution* (N. Y). 1985. Vol. 39, № 4. P. 783–791.
 120. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. Vol. 10, № 3. P. 564–567.
 121. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics.* 2009. Vol. 25, № 11. P. 1451–1452.
 122. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979. Vol. 76, № 10. P. 5269–5273.
 123. Nei M., Tajima F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. // *Genetics.* 1981. Vol. 97, № 1. P. 145–163.
 124. Weir, B.S. and Cockerham C.C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure // *Evolution* (N. Y). 1984. Vol. 38, № 6. P. 1358–1370.
 125. Rogers A.R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. // *Mol. Biol. Evol.* 1992. Vol. 9, № March. P. 552–569.
 126. Drummond A.J. et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences // *Mol. Biol. Evol.* 2005. Vol. 22, № 5. P. 1185–1192.
 127. Никольский Г.В. Материалы по ихтиофауне городищ бассейнов Ветлуги и Вятки // *Зоологический журнал.* 1935. Т. 14, № Вып.1. с. 79–96.

128. Лебедев В.Д. Результаты предварительного просмотра костных остатков рыб из раскопок селения Балымеры 1954 г. (Жиромский Б.Б. Древнеродовое святилище Шолом. Приложение к статье) // Матер. и исслед. по археологии СССР. 1958. № 61. с. 424–450.
129. Соколов Л.И., Цепкин Е.А. Стерлядь *Acipenser ruthenus* L. в среднем и позднем голоцене // Бюл. МОИП. Отд. биология. 1971. Т. LXXVI, № Вып. 3. с. 137–145.
130. Аськеев И.В., Аськеев О.В., Галимова Д.Н. Археоихтиологические исследования на территории Волжско-Камского края // Археология и естественные науки Татарстана. Кн. 4. Казань: Фолиант; Ин-т истории АН РТ, 2011. с. 44–156.
131. Аськеев И.В., Галимова Д.Н., Аськеев О.В. Ихтиофауна позднего голоцена Средневолжского бассейна (по материалам археологических раскопок) // Зоологический журнал. 2013. Т 92, № Вып. 9. с. 1014–1030.
132. Шаймуратова Д.Н. с соавт. Стерлядь *Acipenser ruthenus* (*Acipenseriformes*, *Acipenseridae*) средней Волги и нижней Камы в IV–XVIII вв.: размерно-возрастной состав, рост и значение в древнем рыболовстве // Вопросы рыболовства. 2017. Вып. 18, № 4. с. 401–421.
133. Шмидтов А.И. Стерлядь (*Acipenser ruthenus* L.). Материалы по биологии и промыслу стерляди низовьев реки Камы // Уч. зап. Казан. ун-та. Зоология. 1939. Т. 99, № Кн. 4. с. 3–279.
134. Афанасьев Ю.И. Биологическая неоднородность волжской стерляди в речных условиях и факторы, обуславливающие ее изменение в водохранилищах // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. 1981. Вып. 165. с. 76–88.
135. Афанасьев Ю.И. Закономерности изменчивости роста стерляди в условиях незарегулированной Волги в районе Чебоксарского водохранилища до его образования // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. 1985. Вып. 240. с. 73–85.
136. Паллас П.С. Путешествие по разным провинциям Российского государства. Санкт-Петербург, 1773. 658 с.
137. Birstein V.J., Doukakis P., DeSalle R. Molecular Phylogeny of *Acipenseridae*: Nonmonophyly of *Scaphirhynchinae* // *Copeia*. 2002, № 2. P. 287–301.
138. Takada M. et al. Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia // *BMC Evol. Biol.* 2010. Vol. 10, № 1.
139. Yang D.Y. et al. Technical Note: Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1998. Vol. 105. P. 539–543.
140. Sanderson C., Radley K., Mayton L. Ethylenediaminetetraacetic acid in ammonium hydroxide for reducing decalcification time // *Biotech. Histochem.* 1995. Vol. 70, № 1. P. 12–18.
141. Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability // *Mol. Biol. Evol.* 2013. Vol. 30, № 4. P. 772–780.

142. Kearse M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data // *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28, № 12. P. 1647–1649.
143. Silvestro D., Michalak I. RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML // *Org. Divers. Evol.* 2012. Vol. 12, № 4. P. 335–337.
144. Stamatakis A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, № 9. P. 1312–1313.
145. Drummond A.J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 // *Mol. Biol. Evol.* 2012. Vol. 29, № 8. P. 1969–1973.
146. Wang W. et al. Heteroplasmy in mtDNA Control Region and Phylogenetics of Five Sturgeons // *Zool. Res.* 2009. Vol. 30, № 5. P. 487–496.
147. Leigh J.W., Bryant D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction // *Methods Ecol. Evol.* 2015. Vol. 6, № 9. P. 1110–1116.
148. Clement M. et al. TCS networks.pdf // *Proceeding 16th Int. Parallel Distrib. Process. Symp.* 2002. P. 184–190.
149. Brown J.R. et al. Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (*Acipenser*) // *Genetics*. 1996. Vol. 142, № 2. P. 525–535.
150. de La Herrán R. et al. Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. // *Mol. Biol. Evol.* 2001. Vol. 18, № 3. P. 432–436.
151. Krieger J., Fuerst P.A. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order *Acipenseriformes* // *Mol. Biol. Evol.* 2002. Vol. 19, № 6. P. 891–897.
152. Sakai H. et al. Morphological and mtDNA sequence studies on three crucian carps (*Carassius*: *Cyprinidae*) including a new stock from the Ob river system, Kazakhstan // *J. Fish Biol.* 2009. Vol. 74, № 8. P. 1756–1773.
153. Podlesnykh A. V., Apalikova O. V., Brykov V.A. Phylogenetic relationships of silver crucian carp in *Carassius auratus* complex based on mtDNA analysis // *Russ. J. Genet.* 2012. Vol. 48, № 12. P. 1207–1217.
154. Bolnick D.I., Near T. Tempo of hybrid inviability in centrachid fishes (*Teleosti*: *Centrarchidae*) // *Evolution* (N. Y). 2005. Vol. 59, № 598. P. 1754–1767.
155. Birstein V.J., DeSalle R. Molecular phylogeny of *Acipenserinae*. // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1998. Vol. 9, № 1. P. 141–155.
156. Grosswald M.G. An Antarctic - style ice sheet in the northern hemisphere : Toward a new global glacial theory. 1988. № October 2012. P. 37–41.
157. Niessen F. et al. Repeated Pleistocene glaciation of the East Siberian continental margin // *Nat. Geosci. Nature Publishing Group*, 2013. Vol. 6, № 10. P. 842–846.

158. Ohno S. Evolution by gene duplication. Springer. New York, 1970.
159. Taylor J.S., Van De Peer Y., Meyer A. Genome duplication, divergent resolution and speciation // Trends Genet. 2001. Vol. 17, № 6. P. 299–301.
160. Zhou R., Cheng H., Tiersch T.R. Differential genome duplication and fish diversity // Rev. Fish Biol. Fish. 2002. Vol. 11, № 4. P. 331–337.
161. Khanarov M. V., Luk'yanenko V. V., Luk'yanenko V.I. Heterogeneity and polymorphism of hemoglobin and albumin of the Russian sturgeon in the sea and the river life periods // J. Appl. Ichthyol. 2002. Vol. 18, № 4–6. P. 351–358.
162. Krieger J., Fuerst P.A., Cavender T.M. Phylogenetic relationships of the North American sturgeons (order Acipenseriformes) based on mitochondrial DNA sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 2000. Vol. 16, № 1. P. 64–72.
163. Li X.Y. et al. Origin and transition of sex determination mechanisms in a gynogenetic hexaploid fish // Heredity (Edinb). Springer US, 2018. Vol. 121, № 1. P. 64–74.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 111. *Использованные в работе олигонуклеотидные последовательности*

	Последовательность олигонуклеотида	Для чего использовались
CR1m	GTAAGGCCAGGACCAAGCC	Получение ПЦР-продукта контрольного района мтДНК осетровых
CR2m	TCACCCTTAACTCCCAAAGC	Получение ПЦР-продукта контрольного района мтДНК осетровых
CR3	CAGTCCTGATTTTGGGGTTTGAC	Секвенирование по Сэнгеру последовательности контрольного района мтДНК осетровых
CR6	ATGTTTCATCTACCATCAAATGA	Секвенирование по Сэнгеру последовательности контрольного района мтДНК осетровых
ArmtF1	CTCTCACCCTTAACTCCCAAAGC	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
ArmtR1	CCTAGGTTGAGGTCTGCGACC	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
ArmtF2	GGTCGCAGACCTCAACCTAGG	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
ArmtR2	AGGGAGGGCAGGGCAATT	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
ArmtF3	AATTGCCCTGCCCTCCCT	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
ArmtR3	GCTAGGTTGGCAATAAATCATCATG	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
ArmtF4	CATGATGATTTATTGCCAACCTAGC	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
ArmtR4	GCTTTGGGAGTTAAGGGTGAGAG	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
Aba F3	CATTATTGTGGCCATGGTGTCA	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
Aba R2	GGGCACTACCATTTCGATGGTC	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
OS F1	GCTTAGACATCAAAGCACCGGT	Получение фрагментов мтДНК осетровых для гибридизации
OS F2	CGCCCCACCACAGCCT	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых

OS F4	GGCCTAGCATCCTCCGCA	Получение фрагментов мтДНК для создания матрицы для обогащения библиотек мтДНК осетровых
ArF1	TGTTTCATCTACCATCAAATGATAT ACAC	Получение ПЦР-продукта контрольного района мтДНК субфоссильных проб стерляди
ArR1	CCAGATGCCAGTAATAATTCAGTTA TG	Получение ПЦР-продукта контрольного района мтДНК субфоссильных проб стерляди
ArF2	TТААТGAGATGAAGGACAАТАССТ GTAG	Получение ПЦР-продукта контрольного района мтДНК субфоссильных проб стерляди
ArR2	ССАААТGTTGGCАТGGTTCTC	Получение ПЦР-продукта контрольного района мтДНК субфоссильных проб стерляди
ArF3	AGGTACCАТАСACCCАТGACCC	Получение ПЦР-продукта контрольного района мтДНК субфоссильных проб стерляди
ArR3	GTCTTCGAGCAGACCGTGAAT	Получение ПЦР-продукта контрольного района мтДНК субфоссильных проб стерляди
ArF4	ATGCAAAAACGCTCCTTCAGAG	Получение ПЦР-продукта контрольного района мтДНК субфоссильных проб стерляди
ArR4	TGGGAACAAGATTAGGTCCTGTG	Получение ПЦР-продукта контрольного района мтДНК субфоссильных проб стерляди
L15923	TТААAGCАТCGGTCTTGТАА	Получение и секвенирование ПЦР-продукта контрольного района мтДНК серебряного карася
H16150	GCCCTGAAATAGGAACCAGA	Получение и секвенирование ПЦР-продукта контрольного района мтДНК серебряного карася

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Таблица 2П. Выявленные гипервариабельные сайты в последовательностях контрольного района мтДНК стерляди (*A. ruthenus*), шипа (*A. nudiventris*) и белуги (*Huso huso*)

	Позиция, пн	Нуклеотид	Гаплотип или гаплогруппа стерляди	Присутствие этого сайта у других видов осетровых
1	16161	G	A1d	Шип
2	16162	G	Гаплогруппа А	Шип
3	16163	C	I2b, E1, E2a	Белуга
4	16486	C	Гаплогруппа С, B1d, B4, I4e	
5	16187	G	A1c	Белуга
6	16190	T	Гаплогруппа I	Шип
7	16203	G	Гаплогруппа E	Белуга
8	16204	G	Гаплогруппа D	Шип
9	16206	A	KF153104	Белуга
10	16229	T	A2e	Шип
11	16230	C	Гаплогруппа А	Белуга
12	16233	G	E3a, E3b	Шип, Белуга
13	16234	A	J, FJ843097	Шип, Белуга
14	16290	T	KF153104, B1a	Шип
15	16292	A	Гаплогруппа С, Гаплогруппа В, KF153104	
16	16295	G	E, I4, I4a, I4b, I4c, I4e	

17	16298	T	Гаплогруппа А	Белуга
18	16315	T	Гаплогруппа А, В, В4, В5, G	
19	16330	G	I2a, E2a, H	
20	16338	G	Гаплогруппа I, A1e	
21	16339	A	A3f, B1d, C2c, C2C1, F, I3b, I3b1, E1, E2b, G, E2d	
22	16351	T	F, D1, D1a, FJ843097	
23	16353	G	K, E2d	Шип
24	16376	C	J, K	Шип, Белуга
25	16377	A	B1b, Гаплогруппа E	Шип, Белуга
26	16378	C	C2a, KF153104	Шип, Белуга
27	16392	T	Гаплогруппа В, I3c, I4d, Гаплогруппа E	
28	16441	A	A2c, B1	Шип
29	16444	T	Гаплогруппа E	Белуга
30	16446	A	E2d	Белуга
31	16465	C	A3a, A3a1, A3e, A3e1, B, F, G, H, Haplogroup E	
32	16466	A	Haplogroup I, J, K, L, Haplogroup D	Белуга
33	16467	A	A3e, A3e1, J, D1, D1a, A1c	Шип
34	16468	C	B1b	Шип, Белуга
35	16475	A	A1a, A1b, A1c, Гаплогруппа I	

36	16476	A	D1, D1a, KF153104	Шип
37	16484	A	A1a	Шип, Белуга
38	16489	G	Гаплогруппа А, В4	Шип, Белуга
39	16516	C	A2f, I2c	Белуга
40	16520	G	A1b, B, I3b, I3b1, I3b2, B4, FJ843097	Шип

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Таблица 3П. Расположение точек сбора образцов стерляди

	Местоположение	Район	Географические координаты	Объем выборки
1	Сузунский район, Новосибирская область	Верхняя Обь А	53°71' N, 82°15' E	10
2	Новосибирское водохранилище, Верхняя зона, Новосибирская область	Верхняя Обь А	54°07' N, 81°41' E	12
3	Вороново, Томская область	Верхняя Обь Б	56°02' N, 83°51' E	11
4	Шегарский район, Томская область	Верхняя Обь Б	56°34' N, 84°10' E	23
5	Устье р. Томь, Томская область	Верхняя Обь Б	56°54' N, 84°27' E	8
6	Красный Яр, Томская область	Верхняя Обь Б	57°07' N, 84°23' E	14
7	Колпашево, Томская область	Средняя Обь А	58°29' N, 82°87' E	2
8	Парабель, Томская область	Средняя Обь А	58°41' N, 81°42' E	15
9	Каргасок, Томская область	Средняя Обь А	59°05' N, 80°49' E	1
10	Усть-Тым, Томская область	Средняя Обь А	59°23' N, 79°56' E	10
11	Нефтеюганск, Ханты-Мансийский автономный округ	Средняя Обь Б	61°07' N, 72°67' E	5
12	Омский район, Омская область	Средний Иртыш А	54°84' N, 73°47' E	5
13	Крутая Горка, Омская область	Средний Иртыш А	55°37' N, 73°20' E	4
14	Саргатское, Омская область	Средний Иртыш А	55°57' N, 73°55' E	10
15	Горьковский район, Омская область	Средний Иртыш А	55°68' N, 73°89' E	9
16	Знаменский район, Омская область	Средний Иртыш Б	57°14' N, 73°88' E	10
17	Абалак, Тюменская область	Нижний Иртыш А	58°13' N, 68°58' E	3
18	Устье р. Тобол, Тюменская область	Нижний Иртыш А	58°15' N, 68°21' E	1
19	Горнослинкино, Тюменская область	Нижний Иртыш Б	58°77' N, 68°76' E	38
20	Осинники, Тюменская область	Нижний Иртыш Б	59° 26' N, 68° 78' E	8
21	Кия, Томская область	Чулым	56°43' N, 87°02' E	16
22	Черный Яр, Томская область	Чулым	57°03' N, 87°19' E	5
23	Белый Яр, Томская область	Чулым	57°29' N, 88°56' E	7
24	Вознесенка, Томская область	Чулым	57°12' N, 86°02' E	20
25	Бассейн Енисея	Енисей	60°14' N, 90°13' E 63°20' N, 87°08' E 65°47' N, 87°57' E	65

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Таблица 4П. Все гаплотипы стерляди, полученные в данном исследовании

	Гаплотип	Номер, полученный в GenBank	Количество особей	Регион
1	A1	KU984263	4	Верхняя Обь А (2), Нижний Иртыш В, Средний Иртыш В
2	A1A	KU984264	3	Верхняя Обь А, Верхняя Обь В, Нижний Иртыш А
3	A1B	KU984265	6	Верхняя Обь В (2), Средний Иртыш А, Нижний Иртыш В (2), Чулым
4	A1C	KU984266	1	Чулым
5	A1D	KU984267	1	Верхняя Обь В
6	A1E	KU984268	4	Рыбное хозяйство г. Северск (происхождение – Енисей), Енисей
7	A1E1	MG563822	1	Енисей
8	A1E2	MG563823	1	Енисей
9	A1E3	MG563824	7	Енисей
10	A1E3A	MG563825	1	Енисей
11	A1E3B	MG563826	1	Енисей
12	A1E4	MG563827	1	Енисей
13	A1E5	MG563828	3	Енисей
14	A1E6	MG563829	1	Енисей
15	A1E7	MG563830	1	Енисей
16	A1E8	MG563831	1	Енисей
17	A1E9	MG563832	1	Енисей
18	A1E10	MG563833	2	Енисей
19	A1E11	MG563834	1	Енисей
20	A1E12	MG563835	7	Енисей
21	A1E13	MG563836	2	Енисей

22	A1E14	MG563837	1	Енисей
23	A1E15	MG563838	1	Енисей
24	A1E16	MG563839	1	Енисей
25	A1E17	MG563840	1	Енисей
26	A1F	KU984269	1	Верхняя Обь В
27	A2	KU984270	16	Верхняя Обь В (5), Средняя Обь А (3), Чулым (4), Средний Иртыш А (3), Нижний Иртыш В (1)
28	A2A	KU984271	1	Верхняя Обь В
29	A2B	KU984272	2	Средняя Обь А, Нижний Иртыш В
30	A2C	KU984273	1	Средний Иртыш А
31	A2D	KU984274	6	Средняя Обь В, Чулым (2), Средний Иртыш А, Нижний Иртыш В (2)
32	A2E	KU984275	1	Верхняя Обь В
33	A2F	KU984276	1	Нижний Иртыш В
34	A2G	KU984277	1	Верхняя Обь В
35	A3	KU984278	11	Верхняя Обь В(6), Чулым (1), Средняя Обь А (1), Нижний Иртыш В (3)
36	A3A	KU984279	4	Средний Иртыш А (1), Нижний Иртыш В (3)
37	A3A1	KU984280	1	Нижний Иртыш В
38	A3B	KU984281	1	Нижний Иртыш В
39	A3C	KU984282	1	Верхняя Обь А
40	A3D	KU984283	1	Средняя Обь А
41	A3E	KU984284	2	Чулым, Средний Иртыш А
42	A3E1	KU984285	1	Нижний Иртыш В
43	A3F	KU984286	1	Верхняя Обь А
44	A3G	KU984287	2	Верхняя Обь А
45	A3H	MG5638441	1	Енисей

46	B1	KU984288	14	Верхняя Обь А (1), Верхняя Обь В (4), Средняя Обь А (3), Средняя Обь В (1), Чулым (2), Нижний Иртыш А (1), Нижний Иртыш В (2)
47	B1A	KU984289	1	Средняя Обь В
48	B1B	KU984290	1	Средняя Обь А
49	B1C	KU984291	1	Чулым
50	B1D	KU984292	2	Средний Иртыш А, Нижний Иртыш В
51	B1E	KU984293	3	Верхняя Обь А (1), Енисей (2)
52	B1E1	MG563843	2	Енисей
53	B1E2	MG563844	1	Енисей
54	B1E3	MG563845	4	Енисей
55	B1E3A	MG563846	1	Енисей
56	B1E4	MG563847	4	Енисей
57	B1E5	MG563848	8	Енисей
58	B1E6	MG563849	1	Енисей
59	B1E6A	MG563850	2	Енисей
60	B1G	MG563851	1	Енисей
61	C1	KU984294	10	Верхняя Обь А(1), Верхняя Обь В (3), Средняя Обь А (2), Чулым (2), Средний Иртыш В (1), Нижний Иртыш В (1)
62	C1A	KU984295	5	Верхняя Обь В (2), Чулым (1), Нижний Иртыш (2)
63	C1B	KU984296	6	Верхняя Обь В (1), Средняя Обь В(1), Чулым (1), Средний Иртыш А (3)
64	C1B1	OM928007	1	Кама (бассейн Волги)
65	C1C	KU984297	9	Верхняя Обь А(1), Верхняя Обь В (1), Чулым (3), Средний Иртыш В (1) Нижний Иртыш В (3)
66	C1C1	KU984298	1	Средняя Обь А
67	C1C2	KU984299	1	Нижний Иртыш В

68	C1D	KU984300	1	Средняя Обь В
69	D1	KU984301	16	Верхняя Обь А(2), Верхняя Обь В (3), Чулым (5), Средний Иртыш А (1), Нижний Иртыш В (1), рыбное хозяйство г. Тюмень (4)
70	D1A	KU984302	4	Верхняя Обь В (1), Чулым (2), Средний Иртыш А (1)
71	D1B	MG563852	1	Енисей
72	E1	KU984303	2	Чулым, Средняя Обь А
73	E2A	KU984304	1	Нижний Иртыш В
74	E2B	KU984305	1	Нижний Иртыш В
75	E3A	KU984306	1	Рыбное хозяйство Астрахани (происхождение – Волга)
76	E3A1	OM928005	1	Кама (бассейн Волги)
77	E3B	KU984307	4	Рыбное хозяйство Камы
78	E3G	OM928003	1	Кама (бассейн Волги)
79	F1	KU984308	1	Нижний Иртыш В
80	F2	OM928004		Кама (бассейн Волги)
81	F3	OM928006		Кама (бассейн Волги)
82	G	KU984309	1	Нижний Иртыш В
83	H	KU984310	6	Рыбное хозяйство Камы
84	I1	KU984311	26	Верхняя Обь А (2), Верхняя Обь В (3), Средняя Обь А (4), Чулым (5), Средний Иртыш А (1), Средний Иртыш В (3), Нижний Иртыш А (2), Нижний Иртыш В (6)
85	I1B	KU984312	1	Чулым
86	I2	KU984313	24	Верхняя Обь А(3), Верхняя Обь В (8), Средняя Обь А (1), Чулым (4), Средний Иртыш А (3), Средний Иртыш В (3), Нижний Иртыш (2)
87	I2A	KU984314	2	Верхняя Обь В

88	I2B	KU984315	1	Чулым
89	I2C	KU984316	1	Верхняя Обь В
90	I3	KU984317	1	Средняя Обь А
91	I3A	KU984318	2	Средний Иртыш А (2)
92	I3B	KU984319	2	Нижний Иртыш В, Средняя Обь А
93	I3B1	KU984320	1	Средняя Обь А
94	I3B2	KU984321	3	Верхняя Обь В (1), Средняя Обь А (1), Чулым
95	I3C	KU984322	2	Верхняя Обь А, Чулым
96	I4	KU984323	23	Верхняя Обь А(1), Верхняя Обь В (2), Средняя Обь А (4), Чулым (7), Средний Иртыш А (4), Средний Иртыш В (1), Нижний Иртыш В (4)
97	I4A	KU984324	6	Верхняя Обь А (1), Верхняя Обь В (2), Средняя Обь А (1), Средний Иртыш А (2)
98	I4B	KU984325	1	Верхняя Обь В
99	I4C	KU984326	1	Средний Иртыш А
100	I4E	KU984327	1	Верхняя Обь В
101	J	KU984328	1	Верхняя Обь А
102	K	KU984329	1	Верхняя Обь В
103	L	KU984330	2	Средний Иртыш А, Нижний Иртыш В

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Таблица 5П. Характеристика и место сбора субфоссильных образцов стерляди

	Образец	Возраст	Место сбора	Тип образца
1	a2	кон. XIII- XIV вв.	Самосдельское городище, 2008, Р. I., соор., 42.	Pinna pectoralis I
2	a7	XII-XIII вв.	Мошаик, 2011, Р. I, слой IV.	Pinna pectoralis I
3	a11	кон. XIII- XIV вв.	Водянское городище, 2010, Р. I, пласт II.	Pinna pectoralis I
4	a13	кон. XIII- XIV вв.	Селитренное городище, 2007-2010, Р. 42, штук 5.	Pinna pectoralis I
5	a14	кон. XIII- XIV вв.	Селитренное городище, 2007-2010, Р. 42, штук 6.	Pinna pectoralis I
6	a21	кон. XIII- XIV вв.	Багаевское селище, 2014, Р. 1, яма 36.	Pinna pectoralis I
7	a23	XI-XII вв.	Муромский городок, 2005, Р. 28, сооруж. 82.	Pinna pectoralis I
8	a25	IV-VII вв.	Тетюшское II городище, 2010, Р. 5, яма 1, выборка 1.	Pinna pectoralis I
9	a27	IV-VII вв.	Тетюшское II городище, 2010, Р. 5, яма 3, выборка 3.	Pinna pectoralis I
10	a30	XI-XII вв.	Биллярское городище, 2016, Р. XLIV, кв В- Г/6-7., пласт 8, сооруж. 17, пак. 149И.	Pinna pectoralis I
11	a33	кон. XIII- XIV вв.	Болгарское городище, 2016, Р. СХР II, ям. 86.	Pinna pectoralis I
12	a34	кон. X-XII вв.	Остолоповское селище, 2013, Р. XXII, ям. 2, выб. 6	clavicula, supracleithrale, cleithrum
13	a38	XI-XIV вв.	Кирменское городище, 2008, Р. IX, выб. 3, соор. 1	Pinna pectoralis I

14	a40	XVI-XVII вв.	Казань (двор КГУ), 2002, Р. VI, слой 2.	Cleithrum
15	a45	XV в.	Торецкое поселение, 2007, Р. VII, выб. 1.	Pinna pectoralis I
16	a50	кон. XIII- XV вв.	Мало-Сундырское городище, 2000.	Pinna pectoralis I
17	a53	XVIII в.	Свияжское городище - III	Pinna pectoralis I
18	a58	XIII-XV вв.	Елабужское городище, 2003, Р. IX, в. 4, соор. 1	Pinna pectoralis I

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Таблица 6П. Номера GenBank для образцов субфоссильных проб, а также точные координаты разрыва в последовательности контрольного района мтДНК

Образец	Номера последовательностей в Genbank	Протяженность разрыва	Координаты начала	Координаты окончания
an34	OM927985	44	16210	16253
an25	OM927986	24	16229	16252
an23	OM927987	0	NA	NA
an53	OM927988	29	16225	16253
an21	OM927989	29	16226	16254
an13	OM927990	42	16221	16262
an58	OM927991	28	16226	16253
an27	OM927992	34	16229	16262
an50	OM927993	30	16225	16254
an14	OM927994	26	16228	16253
an40	OM927995	29	16225	16253
an33	OM927996	27	16227	16253
an38	OM927997	32	16229	16260
an30	OM927998	25	16229	16253
an2	OM927999	27	16226	16252
an11	OM928000	30	16229	16258
an45	OM928001	23	16231	16253
an7	OM928002	0	NA	NA

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Таблица 7П. Координаты проверенных сайтов дезаминирования в последовательностях субфоссильных образцов стерляди

	Высокий приоритет		Средний приоритет		Низкий приоритет	
	С->Т	G->A	С->Т	G->A	С->Т	G->A
Координаты на полученных нами последовательностях	65	118	56	104	5	18
	175	146	57	115	9	23
	262	252	69	207	63	25
	263	298	227	251	75	55
	327	325	323	339	98	58
	368	333		342	142	64
	383	334			144	67
		354			209	73
					219	74
					307	99
					320	116
					326	131
					341	134
					374	145
					379	161
					406	204
						242
						248
						250
						265
					299	
					322	
					347	
					371	
					378	
					380	
					398	
					407	
Координаты на референсной последовательности	16153	16206	16144	16192	16093	16106
	16263	16234	16145	16203	16097	16111
	16350	16340	16157	16295	16151	16113
	16351	16440	16315	16339	16163	16143
	16469	16467	16465	16481	16186	16146
	16510	16475		16484	16230	16152
	16525	16476			16232	16155
		16496			16297	16161
					16307	16162
					16449	16187
					16462	16204
					16468	16219
					16483	16222
					16516	16233
					16521	16249
				16548	16292	
					16330	

						16336
						16338
						16353
						16441
						16464
						16489
						16513
						16520
						16522
						16540
						16549

ПРИЛОЖЕНИЕ 8

Таблица 8П. Расположение точек сбора образцов сибирского осетра

	Местоположение	Район	Географические координаты	Объем выборки
1	с. Аксарка, Ямало-Ненецкий автономный округ	Нижняя Обь	66°33'32" с. ш. 67°48'13" в. д.	18
2	Салехард, Ямало-Ненецкий автономный округ	Нижняя Обь	66°32'00" с. ш. 66°38'00" в. д.	2
5	с. Александровское, Томская область	Средняя Обь	60°26'00" с. ш. 77°54'00" в. д.	17
6	с. Каргасок, Томская область	Средняя Обь	59°03'28" с. ш. 80°52'16" в. д.	10
7	с. Парабель, Томская область	Средняя Обь	58°42'00" с. ш. 81°29'00" в. д.	18
8	Кривошеинский р-н, Томская область	Верхняя Обь	57°21'00" с. ш. 83°56'00" в. д.	15
9	с. Вороново, Томская область	Верхняя Обь	56°00'00" с. ш. 83°48'00" в. д.	8
10	Новосибирское водохранилище	Верхняя Обь	54°38' с. ш. 82°38' в. д.	5
11	с. Вознесенка, Томская область	Чулым	57°12' N, 86°02' E	24
12	пос. Абалак, Тюменская область	Иртыш	58°07'47" с. ш. 68°35'51" в. д.	29
13	с. Ярцево, Красноярский край	Енисей	60°14'42" с. ш. 90°13'19" в. д.	13
14	устье р. Елогуй, Красноярский край	Енисей	63°13'21" с. ш. 87°44'05" в. д.	5
15	с. Туруханск, Красноярский край	Енисей	65°47'35" с. ш. 87°57'44" в. д.	18
16	Норильск, Красноярский край	Енисей	69°20'00" с. ш. 88°13'00" в. д.	66
17	п. Тикси, республика Саха	Лена	71°38'12" с. ш. 128°52'04" в. д.	6
18	о. Столб, республика Саха	Лена	72°23'43"N 126 °39'34"E	5
19	пос. Жиганск, республика Саха	Лена	66°46'55" с. ш. 123°22'05" в. д.	29
20	о. Тайменский, республика Саха	Лена	62°59'54" с. ш. 129°31'55" в. д.	7
22	река Колыма		69°33'05" с. ш. 161°21'51" в. д.	1
23	река Индигирка		71°26'44" с. ш. 150°51'39" в. д.	2

25	пос. Тазовский		67°27'00" с. ш. 78°42'00" в. д.	3
----	----------------	--	------------------------------------	---

ПРИЛОЖЕНИЕ 9

Таблица 9П. Все гаплотипы сибирского осетра, полученные в данном исследовании

	Гаплотип	Количество особей	Район
1	A1a	40	Верхняя Обь (7), Средняя Обь (9), Нижняя Обь (9), Чулым (1), Иртыш (4), Енисей (9), Лена (1)
2	A1a1	5	Средняя Обь (1), Чулым (1), Енисей (2), Лена (1)
3	A1a2	1	Нижняя Обь
4	A1a3	2	Иртыш, Енисей
5	A1a3a	1	Чулым
6	A1a4	1	Таз
7	A1a4a	1	Енисей
8	A1a5	6	Енисей (4), Лена (2)
9	A1a5c	3	Енисей
10	A1a5d	5	Енисей
11	A1a5d1	1	Енисей
12	A1a5e	1	Таз
13	A1a5f	2	Енисей
14	A1a5g	1	Енисей
15	A1a5h	1	Енисей
16	A1a6	2	Лена
17	A1a7	2	Енисей
18	A1a8	2	Чулым
19	A1a9	1	Енисей
20	A1a10	1	Енисей
21	A1c	21	Верхняя Обь (3), Средняя Обь (3), Нижняя Обь (2), Чулым (2), Иртыш (11)

22	A1c1	2	Иртыш
23	A1c2	1	Нижняя Обь
24	A1c3	1	Средняя Обь
25	A2	66	Верхняя Обь (1), Средняя Обь (2), Чулым (1), Енисей (39), Лена (21), Колыма (1), Индигирка (1)
26	A2a	9	Верхняя Обь (2), Средняя Обь (2), Чулым (4), Иртыш (1)
27	A2c	3	Средняя Обь (1), Енисей (2)
28	A2d	1	Лена
29	A2e	1	Лена
30	A2e1	3	Лена
31	A2j	2	Лена
32	A2k	1	Енисей
33	A2l	1	Енисей
34	A2m	1	Енисей
35	A2o1	1	Енисей
36	A2p	1	Енисей
37	A2q	1	Енисей
38	A2r	2	Енисей
39	A3	17	Верхняя Обь (3), Средняя Обь (3), Чулым (6), Иртыш (1), Лена (4)
40	A3a	4	Верхняя Обь (3), Средняя Обь (1)
41	A3a1	1	Средняя Обь
42	A3a2	1	Средняя Обь
43	A3b	10	Верхняя Обь (3), Средняя Обь (4), Нижняя Обь (2), Чулым (1)
44	A3c	18	Верхняя Обь (1), Средняя Обь (6), Нижняя Обь (2), Иртыш (6), Енисей (2), Лена (1)

45	A3c1	2	Лена (1), Индигирка (1)
46	A3d	8	Енисей (2), Лена (6)
47	A3d1	1	Лена
48	A3f	1	Таз
49	A3j	1	Енисей
50	A3k	1	Енисей
51	A4	7	Верхняя Обь (1), Средняя Обь (1), Иртыш (2), Енисей (3)
52	A4a	1	Чулым
53	A4b	1	Верхняя Обь
54	A4c	5	Енисей
55	A5	3	Верхняя Обь (1), Чулым (2)
56	A6	1	Средняя Обь
57	B0	12	Верхняя Обь (1), Средняя Обь (7), Нижняя Обь (2), Иртыш (2)
58	B1	1	Верхняя Обь
59	B2	3	Средняя Обь (1), Чулым (2)
60	B3	2	Енисей
61	B4	1	Енисей

ПРИЛОЖЕНИЕ 10

Таблица 10П. Гаплотипы серебряного карася в Обь-Иртышском бассейне

Название гаплотипов	Кол-во особей	Место сбора материала	Ранее описанные или близкие гаплотипы в GenBank
A0	46	оз. Штаны, р. Обь (Александровский р-н), р. Обь (Парабельский р-н), оз. Сартлан, оз. Монатка	AB274416 р. Чара, Казахстан (Sakai et al 2009) GQ985470 р. Амур GQ985471 бассейн р. Волга JN790649 оз. Ханка
A1	2	Оз. Штаны, р. Обь (Парабельский р-н)	JN790653 оз. Ханка JN790655.1 оз. Ханка
A2	2	Оз. Штаны, оз. Монатка	JN790652 оз. Ханка
A3	1	р.Обь (Александровский р-н)	-
A4	8	оз. Штаны, р. Обь (Парабельский р-н), оз. Монатка, оз. Чаны	JN790650 оз. Ханка JN790655 оз. Ханка AB080014 FJ167410.1 Европа JN117600.1 Польша (Wouters et al 2012)
A5	8	оз. Чаны оз. Яркуль	JN790668.1 оз. Ханка (близкий гаплотип) FJ167413 (близкий гаплотип) DQ984994.1(близкий гаплотип)
A6	13	оз. Чаны оз. Яркуль оз. Костомар (Казахстан)	AB274415.1 р. Чара, Казахстан (Sakai et al 2009)
B0	1	р. Обь (Александровский р-н),	GQ985474 о. Сахалин оз. Безымянное FJ167424.1 Европа AB274413 Оз. Михайловское, Казахстан (близкий гаплотип) (Sakai et al 2009) GQ985481.1 р. Камчатка (близкий гаплотип) GQ985473.1 р. Раздольная, Приморье (близкий гаплотип) JN790652.1 оз. Ханка Китай (близкий гаплотип)
B1	2	р. Обь (Александровский р-н) оз. Монатка	-