

НИЗКИЙ УРОВЕНЬ РАЗЛИЧИЙ МИТОГЕНОМОВ САХАЛИНСКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER MIKADOI* HILGENDORF, 1892 И ЗЕЛЁНОГО ОСЕТРА *A. MEDIROSTRIS* AYERES, 1854 (ACIPENSERIDAE) СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ ОБ ИХ НЕДАВНЕЙ ДИВЕРГЕНЦИИ*

© 2017 г. С. В. Шедько

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, 690022

e-mail: shedko@biosoil.ru

Статья принята к печати 29.09.2016 г.

С использованием технологии Roche 454 секвенированы полный митохондриальный геном сахалинского осетра *Acipenser mikadoi*, а также два митогенома амурского осетра *A. schrenckii*. Установлено, что митогеном сахалинского осетра и взятый из Genbank митогеном зелёного осетра *A. medirostris* различаются так же, как митогеномы из двух мтДНК-гаплогрупп SM и BG, встречающихся в одной и той же популяции амурского осетра: 0.0042 ± 0.0006 и 0.0036 ± 0.0005 замещений на сайт соответственно (расстояние Тамуры–Нея, TrN). Отличия этих пар митогеномов от митогеномов сестринских видов калуги *A. dauricus* и белого осетра *A. transmontanus* в 3–6 раз больше, соответственно 0.0260 ± 0.0015 и 0.0102 ± 0.0008 . Это позволяет отнести различия митогеномов сахалинского и зелёного осетра к внутривидовому уровню изменчивости. Высказано мнение, что с момента дивергенции сахалинского и зелёного осетра прошло намного меньше времени, чем считалось ранее, – примерно 0.16, а не 9.60 млн. лет.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, скорость нуклеотидных замещений, *Acipenser mikadoi*, таксономический ранг.

The low level of differences between mitogenomes of the Sakhalin sturgeon *Acipenser mikadoi* Hilgendorf, 1892 and the green sturgeon *A. medirostris* Ayeres, 1854 (Acipenseridae) indicates their recent divergence. S. V. Shedko (Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022)

The complete mitochondrial genome of the Sakhalin sturgeon *Acipenser mikadoi* and two mitogenomes of the Amur sturgeon *A. schrenckii* were sequenced using the Roche 454 technology. Mitogenomes of the green sturgeon *A. medirostris* (obtained from GenBank) and the Sakhalin sturgeon differ as much as mitogenomes of two mtDNA haplogroups (SM and BG) found in the same population of Amur sturgeon: 0.0042 ± 0.0006 and 0.0036 ± 0.0005 substitutions per site (Tamura–Nei distance, TrN), respectively. The differences of these mitogenome pairs from mitogenomes of sister species (kaluga *A. dauricus* and white sturgeon *A. transmontanus*) are 3–6 times as large (0.0260 ± 0.0015 and 0.0102 ± 0.0008 , respectively). Thus, the differences between mitogenomes of Sakhalin and green sturgeons can be attributed to the variability at the intraspecific level. The time that has passed since the divergence of Sakhalin and green sturgeons is supposed to be much shorter than was previously believed: about 0.16 rather than 9.60 million years. (Biologiya Morya, 2017, vol. 43, no. 2, pp. 144–147).

Keywords: mitochondrial DNA, rate of nucleotide substitutions, *Acipenser mikadoi*, taxonomic rank.

Сахалинский осётр *Acipenser mikadoi* Hilgendorf, 1892 – редкий и малоизученный вид тихоокеанских осетров. Это анадромный осётр, нагульный ареал которого охватывает континентальное побережье от Амурского лимана и Татарского пролива на севере до р. Туманная на юге, а также острова Сахалин и Хоккайдо. Единственное известное место размножения *A. mikadoi* – р. Тумнин. Как во всем ареале, так и в нерестовой реке встречается единично: с 1986 по 2009 г. во время научного отлова в р. Тумнин было поймано лишь 50 разновозрастных рыб (Артюхин, Андронов, 1990; Микодина и др., 2010). Сахалинский осётр придерживается эстуариев и морских заливов, где может случайно попадать в промышленные ставные невода и жаберные сети, выставленные при ловле лососевых и других рыб. Был сравнительно редок

и в начале прошлого века (Солдатов, 1915). Находится в Красной книге Российской Федерации в статусе вида под угрозой исчезновения (1-я категория).

До 90-х годов прошлого века *A. mikadoi* либо отождествляли с зелёным осетром *A. medirostris* Ayeres, 1854, распространенным на тихоокеанском побережье Северной Америки, либо рассматривали в качестве его подвида (Артюхин, Андронов, 1990). Сахалинский и зелёный осетры морфологически и экологически чрезвычайно близки, но последний вид обычен, в 1985–1993 гг. его ежегодные уловы составляли от 4051 до 9012 экз. (Adams et al., 2002). Основаниями для поднятия ранга сахалинского осетра до видового были его отличие от зелёного осетра в плоидности генома (8n против 4n по современной шкале) и тот факт, что по митохондриальной ДНК зе-

* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Дальневосточного отделения РАН (грант № 15-1-6-079).

лѐный осетр оказывался в одной кладе не с сахалинским, а с белым осетром *A. transmontanus* (см.: Birstein, Bemis, 1997 и цитируемую в этой статье литературу). Впоследствии и то, и другое было опровергнуто новыми данными (Васильев и др., 2008; Вишнякова и др., 2008; Krieger et al., 2008; Vasil'ev et al., 2010; Zhou et al., 2011). Однако были подобраны морфологические характеристики, позволяющие дифференцировать сахалинского и зелёного осетров (Colway, Stevenson, 2007; Vasil'eva et al., 2009). Кроме того, было показано их различие по структуре кариотипов и на этом основании было предложено оставить сахалинского осетра в ранге отдельного вида (Vasil'eva et al., 2009). К сожалению, признать это заключение окончательным не позволяет малое (из-за редкости *A. mikadoi*) число проанализированных особей.

Изменчивость мтДНК у сахалинского и зелёного осетров исследовали на единичных экземплярах и фрагментарно (Zhang et al., 2001; Вишнякова и др., 2008; Krieger et al., 2008). Цель настоящей работы – охарактеризовать различия сахалинского и зелёного осетров по полному митохондриальному геному (митогеному).

Материал и методика. Материалом для исследования послужила тотальная ДНК, выделенная стандартным фенол-хлороформным методом с использованием протеиназы К от одного из 11 сеголеток сахалинского осетра, взятых в августе 2008 г. на Анюйском рыбноводном заводе (Хабаровский край). Ранее у этих особей были изучены состав и структура кариотипов (Васильев и др., 2008; Vasil'ev et al., 2010). Все сеголетки происходили от одной и той же самки сахалинского осетра, отловленной в 2008 г. в р. Тумнин*.

Полный митохондриальный геном сахалинского осетра был амплифицирован в двух реакциях с помощью набора 6kB+ (СибЭнзим, г. Новосибирск) с использованием двух пар праймеров (Inoue et al., 2001): S-LA-16S-L и H12293-Leu, L12321-Leu и S-LA-16S-H. Секвенирование полученных ампликонов, смешанных в эквимлярной пропорции, проводили на приборной базе ЦКП "Биотехнология и генетическая инженерия" (Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток) методом пиросеквенирования с помощью секвенатора Roche GS Junior. Приготовление быстрой библиотеки с лигированными адаптерами, проведение эмульсионной ПЦР и секвенирование с реагентами GS Junior Titanium Series выполняли согласно инструкциям фирмы-изготовителя прибора и реактивов: 454 Life Science Corp., A Roche Company, Branford, CT 06405, USA.

В качестве сравнительного материала аналогичным образом амплифицировали и секвенировали два митогенома амурского осетра *A. schrenckii*, представлявших две мтДНК-гаплогруппы – BG и SM (гаплотипы SCH1 и SCH52 соответственно), выявленные у этого вида ра-

нее (Шедько и др., 2015). Все три митогенома осетров секвенировали с использованием трех индивидуальных RL MID-адаптеров в одном запуске прибора вместе с другими образцами. Анализ полученных прочтений и сборку митогеномов осуществляли с помощью пакета программ GS De Novo Assembler v.2.7 (Roche). Секвенированные митогеномы анализировали вместе с митогеномами трех других видов тихоокеанских осетров, взятыми из GenBank (NCBI) – зелёного осетра *A. medirostris* (NC_0248405), калуги *A. dauricus* (NC_023837) и белого осетра *A. transmontanus* (NC_004743). Сравнительный анализ митогеномов выполнен с помощью программ PAUP v.4a147 (Swofford, 2002) и MEGA6 (Tamura et al., 2013).

Результаты и обсуждение. Митогеном сахалинского осетра был секвенирован со средним покрытием 158 ± 39 , митогеномы амурского осетра – с покрытием 113 ± 27 (гаплотип SCH1) и 191 ± 50 (SCH52). Собранные последовательности были депонированы в GenBank (NCBI) под номерами доступа KX276658–KX276660.

Размер митохондриального генома у сахалинского осетра составил 16610 пар нуклеотидов (пн), что на одну позицию меньше, чем у митогенома у зелёного осетра (16611 пн). Размер митогенома у одной особи амурского осетра был определен в 16676 пн (гаплотип SCH52), у другой – в 16690 пн (гаплотип SCH1). Различие вызвано сравнительно протяженной делецией в контролирующем регионе мтДНК (D-петле), дифференцирующей гаплогруппы SM и BG амурского осетра (Шедько и др., 2015). В свою очередь, различие в размерах митогеномов у сахалинского и зелёного осетров, с одной стороны, и у амурского осетра – с другой, обусловлено большим числом копий повторяющихся элементов в контролирующем регионе мтДНК исследованных особей амурского осетра (3.5 против 2.5 у сахалинского и зелёного осетров). При последующих расчетах из всех копий повторяющихся элементов в контролирующем регионе мтДНК осетров, как и ранее (Шедько и др., 2015), оставляли лишь предпоследнюю полную и последнюю неполную копию.

Митогеномы сахалинского и зелёного осетра различались по 69 нуклеотидным позициям (0.0042 ± 0.0006 – расстояние Тамуры–Нея, TrN). Шесть из 69 нуклеотидных замещений приводили к аминокислотным заменам: три в гене *ND5* и по одной в генах *ND1*, *ND4* и *AT6*. Три из шести аминокислотных замен относятся (Miyata et al., 1979) к радикальным: Ser > Leu в гене *ND5* у зелёного осетра; Ala > Val в гене *ND1* и Glu > Lys в гене *AT6* у сахалинского осетра.

Гаплотипы SCH1 и SCH52 амурского осетра различались по 60 нуклеотидным позициям (0.0036 ± 0.0005). В последовательностях белковых генов наблюдались две аминокислотные замены – в генах *ND2* (радикальная замена Thr > Ile у гаплотипа SCH52) и *COI*.

Вдоль митохондриального генома нуклеотидные замещения были распределены неравномерно и большин-

*Со всеми превратностями и перипетиями получения данного потомства можно ознакомиться в полнометражном документальном фильме Алексея Черняка "Сахалинский осетр", выпущенном в 2009 г. (доступен на интернет-ресурсе Youtube: <https://youtu.be/9kHkhFWw3hc>).

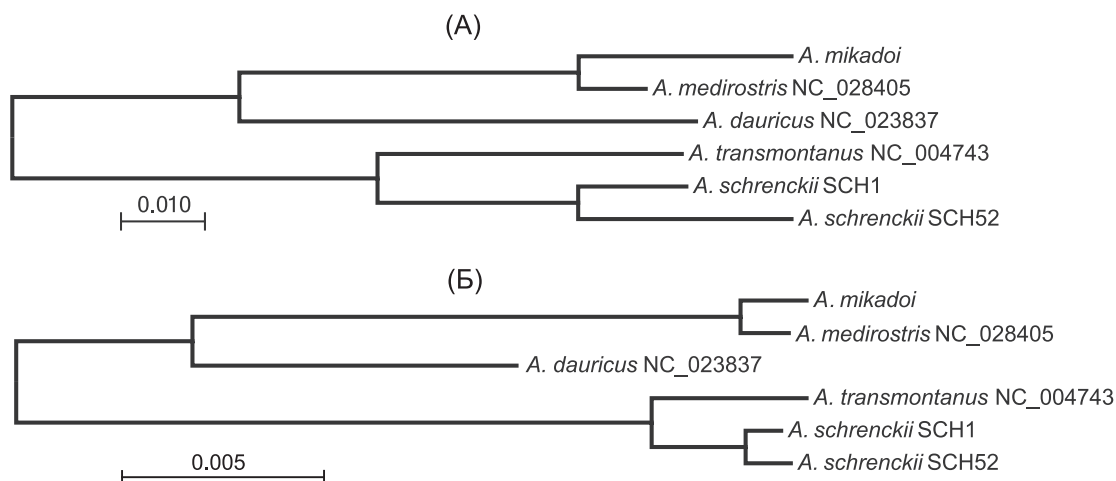
ство из них приходилось на D-петлю. В сравнительно коротком учетном участке контролирующего региона мт-ДНК сахалинского и зелёного осетров (828 пн) найдено 25 нуклеотидных замещений (0.0316 ± 0.0062), в то время как во всей оставшейся части митогенома (15715 позиций в матрице данных) – лишь 44 (0.0028 ± 0.0005). Аналогичную картину наблюдали при сравнении гаплотипов SCH1 и SCH52 амурского осетра: 29 нуклеотидных замещений в контролирующем регионе (0.0378 ± 0.0073) и 31 нуклеотидное замещение (0.0020 ± 0.0003) в остальной части митогенома. Эти оценки показывают, что у осетров скорость нуклеотидных замещений в контролирующем регионе на порядок (в 10–20 раз) выше, чем в остальной части митохондриального генома.

Согласно полученным данным, генетические расстояния между митохондриальными геномами сахалинского и зелёного осетров приблизительно такие же, как между митогеномами SCH1 и SCH52 амурского осетра. Расстояния между митогеномами этих видов и митогеномами ближайших к ним видов осетров – калуги для первой пары и белого осетра для второй (см. рисунок) – намного больше (в целом 0.0260 ± 0.0015 и 0.0102 ± 0.0008 соответственно), что позволяет нам вслед за другими авторами (Zhang et al., 2001) отнести различия по мтДНК между сахалинским и зелёным осетрами к разряду внутривидовых. Известно, что однозначных правил по установлению таксономического ранга для близкородственных, но не идентичных и географически изолированных популяций не существует. Часто это решается путем консенсуса по совокупности имеющихся данных. Дискуссия в отношении ранга сахалинского осетра, очевидно, закончится лишь тогда, когда обозначенные морфологические различия сахалинского и зелёного осетров (Colway, Stevenson, 2007; Vasil'eva et al., 2009) будут оценены статистически на показательном сравнительном материале.

Независимо от того, является ли сахалинский осетр отдельным видом, подвидом или географически изоли-

рованной популяцией, судя по полученным генетическим расстояниям (см. рисунок), ясно, что сахалинский и зелёный осетры разделились приблизительно в то же время, когда разделились мтДНК-гаплогруппы SM и BG амурского осетра. Согласно молекулярному датированию, произведенному на основе компилятивных данных по митохондриальному гену цитохром b (Peng et al., 2007), сахалинский и зелёный осетры дивергировали около 9.6 млн. лет назад. Эта оценка представляется нам многократно завышенной. Если с ней согласиться, то скорость нуклеотидных замещений в D-петле осетров должна составлять 1.64×10^{-9} ($0.0316/2/9600000$) замещений на позицию на линию в год. Тогда, например, эффективная численность самок в популяции амурского осетра, рассчитанная на основе байесовского скайлайна аналогично тому, как было сделано ранее (Шедько и др., 2015), составит невероятно большую величину – около 2 млн. особей. Известно, что эффективная численность популяции, как правило, составляет лишь малую долю ($1/10$, а часто и того меньше) от общего числа половозрелых особей в ней (Frankham, 1995). Поэтому в прошлом, когда численность амурских осетровых ещё не была серьезно подорвана промыслом, существование такой многомиллионной популяции амурского осетра должно было проявиться в виде его интенсивного хода на Нижнем Амуре в период сезонных миграций. По мощности он мог быть сравним с ходом кеты *Oncorhynchus keta* в р. Амур. Однако описание такого явления в первой монографической сводке по осетровым Амура (Солдатов, 1915) отсутствует.

По другой калибровке, сделанной на основе данных по недавно (10–12 тыс. лет назад) разделившимся популяциям белого осетра, скорость эволюции D-петли осетров на два порядка выше – $1.1\text{--}1.3 \times 10^{-7}$ замещений/позицию/линию/год (Brown et al., 1993). Основываясь на этой оценке, мы определили, что время, прошедшее с момента дивергенции BG и SM гаплогрупп амурско-



ML-деревья (оптимальная модель нуклеотидных замещений в обоих случаях – TrN+I), суммирующие различия митогеномов пяти видов тихоокеанских осетров рода *Acipenser* по двум подразделениям: контролирующему региону (А) и остальной части митохондриального генома (Б).

го осетра, составляет около 160 тыс. лет (Шедько и др., 2015, см. рис. 4). Тогда и время с момента дивергенции сахалинского и зелёного осетров должно быть принципиально сходным.

В заключение отметим любопытную деталь. Основываясь на существующих ограниченных данных, мы полагаем, что крайне низкая численность сахалинского осетра не очень сильно сказалась на разнообразии вариантов его мтДНК. Так, анализируя рис. 2 и таблицу из опубликованной работы (Вишнякова и др., 2008), можно понять, что секвенирование Д-петли у семи диких особей сахалинского осетра выявило шесть гаплотипов (пять из шести вариантов этих нуклеотидных последовательностей, к сожалению, остались неопубликованными). Следовательно, оценка генного разнообразия для них равна 0.82, что составляет 93% от величины, максимально возможной для выборки данного размера. Для уточнения генетического потенциала сохранившихся в природе особей сахалинских осетров требуется анализ дополнительного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Артюхин Е.Н., Андронов А.Е. Морфобиологический очерк зелёного осетра *Acipenser medirostris* (Chondrostei, Acipenseridae) из реки Тумнин (Датта) и некоторые аспекты экологии и зоогеографии осетровых // Зоол. журн. 1990. Т. 69, № 12. С. 81–91.
- Васильев В.П., Васильева Е.Д., Шедько С.В., Новомодный Г.В. Кариотипы калуги *Huso dauricus* и сахалинского осетра *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae, Pisces) // Биоразнообразие и динамика генофондов. Подпрограмма II "Динамика генофондов": Материалы отчет. конф. 2008. М. С. 19–21.
- Вишнякова Х.С., Мюге Н.С., Зеленина Д.А. и др. Культура клеток и кариотип сахалинского осетра *Acipenser mikadoi* // Биол. мембраны. 2008. Т. 25, № 6. С. 434–447.
- Микодина Е.В., Хрисанфов В.Е., Пресняков А.В. Река Тумнин как репродуктивный водоем сахалинского осетра *Acipenser mikadoi*: экология и сопутствующая ихтиофауна // Тр. ВНИРО. 2010. Т. 148. С. 68–85.
- Солдатов В.К. Исследования осетровых Амура // Материалы к познанию русского рыболовства. 1915. Т. 3, вып. 12. С. 96–415.
- Шедько С.В., Мирошниченко И.Л., Немкова Г.А. и др. Изменчивость митохондриальной ДНК, историческая демография и популяционная структура амурского осетра *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 // Генетика. 2015. Т. 51, № 2. С. 206–216.
- Adams P.B., Grimes C.B., Hightower J.E. et al. Status review for North American green sturgeon, *Acipenser medirostris*. Santa Cruz, Calif.: NOAA, National Marine Fisheries Service, Southwest Fisheries Science Center. 2002. 57 p.
- Birstein V.J., Bemis W.E. How many species are there within the genus *Acipenser*? // Environ. Biol. Fishes. 1997. Vol. 48, no. 1. P. 157–163.
- Brown J.R., Beckenbach A.T., Smith M.J. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) // Mol. Biol. Evol. 1993. Vol. 10, no. 2. P. 326–341.
- Colway C., Stevenson D.E. Confirmed records of two green sturgeon from the Bering Sea and Gulf of Alaska // Northwest. Nat. 2007. Vol. 88, no. 3. P. 188–192.
- Frankham R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review // Genet. Res. 1995. Vol. 66, no. 2. P. 95–107.
- Inoue J.G., Miya M., Tsukamoto K., Nishida M. A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 2001. Vol. 20, no. 2. P. 275–285.
- Krieger J., Hett A.K., Fuerst P.A. et al. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited // J. Appl. Ichthyol. 2008. Vol. 24, Suppl. 1. P. 36–45.
- Miyata T., Miyazawa S., Yasunaga T. Two types of amino acid substitutions in protein evolution // J. Mol. Evol. 1979. Vol. 12, no. 3. P. 219–236.
- Peng Z., Ludwig A., Wang D. et al. Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes) // Mol. Phylogenet. Evol. 2007. Vol. 42, no. 3. P. 854–862.
- Swofford D.L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland, Mass.: Sinauer Assoc. 2002.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30, no. 12. P. 2725–2729.
- Vasil'ev V.P., Vasil'eva E.D., Shedko S.V., Novomodny G.V. How many times has polyploidization occurred during acipenserid evolution? New data on the karyotypes of sturgeons (Acipenseridae, Actinopterygii) from the Russian Far East // J. Ichthyol. 2010. Vol. 50, no. 10. P. 950–959.
- Vasil'eva E.D., Vasil'ev V.P., Shedko S.V., Novomodny G.V. The validation of specific status of the Sakhalin sturgeon *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae) in the light of recent genetic and morphological data // J. Ichthyol. 2009. Vol. 49, no. 10. P. 868–873.
- Zhang S.-M., Wu Q.-J., Zhang Y.-P. On the taxonomic status of Yangtze sturgeon, Asian and American green sturgeon based on mitochondrial control region sequences // Acta Zool. Sin. 2001. Vol. 47, no. 6. P. 632–639.
- Zhou H., Fujimoto T., Adachi S. 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, no. 2. P. 484–491.