

**ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПО ФИЛОГЕОГРАФИИ
СИБИРСКИХ УСАТЫХ ГОЛЬЦОВ *BARBATULA TONI*
(DYBOWSKI, 1869) (CYPRINIFORMES, NEMACHEILIDAE)
ЮГА РОССИЙСКОГО ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА**

А.А. Семенченко, Н.А. Зырянова, О.А. Веляев

*Дальневосточный федеральный университет, ул. Суханова, 8, Владивосток, 690950, Россия.
E-mail: semenchenko_alexander@mail.ru*

В работе приводятся результаты сравнительного анализа последовательностей нуклеотидов семи фрагментов мтДНК сибирских усатых гольцов *Barbatula toni* (Dybowski, 1869), собранных в различных частях р. Амур и на сопредельных водотоках. Выявлено восемь монофилетических клад с уровнем дивергенции 2,2–5,8 % (K2P). Полученные данные позволяют обосновать ряд предположений относительно филогеографии усатых гольцов как в основном бассейне р. Амур, так и в сопредельных водотоках. Обсуждается таксономическое положение амурских усатых гольцов.

**PRELIMINARY DATA FOR THE PHYLOGEOGRAPHY
OF SIBERIAN STONE LOACH *BARBATULA TONI* (DYBOWSKI, 1869)
(CYPRINIFORMES, NEMACHEILIDAE) OF THE SOUTH PART
OF THE RUSSIAN FAR EAST**

A.A. Semenchenko, N.A. Zyrjanova, O.A. Velyaev

*Far Eastern Federal University, Sukhanova str., 8, Vladivostok, 690950, Russia.
E-mail: semenchenko_alexander@mail.ru*

This study represents the comparative analysis of the seven fragments mtDNA sequences of Siberian stone loach *Barbatula toni* (Dybowski, 1869), collected surrounding Amur drainage. Eight monophyletic lineages with a sequences divergence 2,2–5,8 % (K2P) have been identified. Obtained data allow explaining the number of assumption about phylogeographic patterns of Siberian stone loaches in Amur drainage and the surrounding areas. Taxonomic position of Amur stone loaches is discussed.

Введение

С позиции пресноводной биогеографии река Амур и сопредельные водотоки относятся к Амурской переходной области и разделяются на Амурскую и Приморскую провинции. Амурская провинция включает в себя три района – Шантарский, Амурский и Северсахалинский. В свою очередь, Приморская провинция включает в себя два округа – Приморский и Хоккайдский, в первый из которых входит Североприморский, Южноприморский и Южносахалинский районы, а второй включает в себя Курильский район (Черешнев, 1998). Принятое в пресноводной биогеографии районирование южной части

Дальнего Востока по большей части основано на анализе видового состава пресноводной биоты, а также палеонтологических, геологических и геоморфологических сведениях (Черешнев, 1998; Богатов и др., 2007). Работ, выполненных с использованием молекулярно-генетических методов для реконструкции филогеографических событий пресноводных рыб относительно немного (Froufe et al., 2003; 2008; Shedko et al., 2008; Miyazaki et al., 2011; и др.). В то же время, использование филогеографического подхода на отдельных видах позволяет увеличить точность биогеографического районирования (Avice, 2000).

Сибирский усатый голец *Barbatula toni* (Dybowski, 1869) является хорошим модельным объектом для изучения биогеографических сценариев пресноводной фауны по ряду причин. Относительно низкая способность к расселению, небольшие размеры, короткий жизненный цикл, высокая реофильность и экологическая пластичность являются причиной его повсеместного обитания в реках и высокой скорости накопления генетических мутаций (Šediva et al., 2008). Численность голецов обычно возрастает по мере удаления вверх по течению от устья реки (Vlach et al., 2005), а нижнее течение крупных рек может служить для них барьером. Широкий спектр питания этого вида (Горлачева, 2014) совместно с высоким обилием позволяют этим рыбам осваивать самые небольшие водотоки, где он бывает субдоминантным или доминантным видом (Семенченко, 2001). Кроме того, сохранению естественного ареала способствует низкая гастрономическая ценность этого вида и сложность для отлова. Усатые голецы до сих пор остаются одними из наиболее слабоизученных рыб, что подтверждается скромным списком работ с использованием молекулярно-генетического анализа (Šediva et al., 2008; Cao et al., 2012; Kneibelsberger et al., 2014; Geiger et al., 2014; Sember et al., 2015; Wang et al., 2016). Среди пресноводных рыб Амурской переходной области этот вид имеет самый широкий ареал: он обитает во всех биогеографических районах области, помимо Курильского (Черешнев, 1998, Bogutskaya et al., 2008). Все эти причины обуславливают ценность усатых голецов для уточнения границ выделяемых районов и реконструкции биогеографических событий.

Таким образом, можно ожидать, что основные паттерны в изменчивости мтДНК усатых голецов будут отражать не только сложную палеогеографическую историю амурского бассейна, но и основные коэволюционные процессы расселения пресноводной фауны. С этой целью мы исследовали изменчивость семи фрагментов мтДНК с двумя основными генетическими маркерами – ген NADH-дегидрогеназы субъединицы 2 (ND2) и ген цитохромоксидазы субъединицы 1 (COI). Выбор первого участка продиктован высокой скоростью мутационного процесса, что адекватно отражает внутривидовые различия, а второй фрагмент является стандартным для ДНК баркодинга и необходим для уточнения систематического положения таксонов.

Таксономический статус амурских усатых голецов до сих пор вызывает сомнения. Ряд авторов полагает, что в бассейне реки обитает два самостоятельных вида (Bogutskaya et al., 2008; Новомодный, 2014). Один из них является широко распространённым сибирским усатым гоцем *B. toni*. Второй вид обозначен как *B. sp.* (Bogutskaya et al., 2008) или *B. nudus* (Новомодный, 2014). В то же время, приведенных отличительных признаков явно недостаточно для подтверждения видовой самостоятельности двух форм. Сомнения относительно обоснованности разделения двух морфологических форм на разные виды усатых голецов бассейна высказаны А.М. Прокофьевым (2003, 2014). В настоящей работе нами предпринята попытка рассчитать генетические дистанции между двумя предполагаемыми видами, используя приведенные авторами признаки, а также сравнить полученные значения с уровнями внутривидовой и межвидовой дивергенции для рыб семейства Nemacheilidae.

Материал и методы

Материалом для работы послужили сборы усатых голецов собранных в 37 точках р. Амур и сопредельных водотоков в 2013–2016 гг. В качестве внешней группы мы ис-

пользовали образцы рыб в р. Колыма, а также данные генного банка. Всего было проанализировано 109 особей рыб. Условные обозначения образцов, названия водотоков, даты и координаты точек сбора, число проанализированных проб сведены в таблицу 1.

Для отлова рыб использовалась многоходовая ловушка, которая устанавливалась вдоль по течению на плесах и ямах реки, а также ихтиологический сачок с ячейей 4 мм. Кусочек мускулатуры для молекулярно-генетического анализа отрезался с правой стороны тела рыбы, отделялся от шкуры, и помещался в пробирку с 96 % этиловым спиртом. Тушка рыбы и плавники расправлялись с помощью булавки и фиксировались 4 % раствором формальдегида, а после надежной фиксации этикетированная рыба помещалась в раствор. Часть рыб фотографировалась для сохранения цвета и окраски рыб.

Выделение тотальной ДНК проводили с использованием наборов Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit и Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit в соответствии с прилагаемыми протоколами. Финальный объем элюированной в ТЕ буфере тотальной ДНК составлял 70 мкл. Полимеразную цепную реакцию проводили в 10 мкл реакционной смеси, включающей 5 мкл смеси Go Taq Green Master Mix (Promega), по 0,5 мкл каждого праймера (70–90 нг/мкл), 3 мкл деионизированной воды и по 1 мкл тотальной ДНК. Целевой участок мтДНК длиной около 3200 пар нуклеотидов (п.н.) делили на две части. Праймеры для первого участка были комплиментарны фрагментам ND2 и tRNA-Ala и давали продукт с молекулярным весом 1100 п.н., для второго участка праймеры комплиментарны ND2 и tRNA-Lys, а длина продукта составила 2100 пн. Для ПЦР и реакции секвенирования в работе использовалось восемь праймеров собственного производства с использованием полных митогеномов усатых гольцов из генного банка GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) и программ GeneRunner 6. Полученные ампликоны детектировались с помощью метода электрофореза в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием с дальнейшей визуализацией в геледокументирующей системе GelDoc XR+ (Bio-Rad). Положительные ампликоны были ферментативно очищены экзонуклеазой 1 (ExoI) и термочувствительной щелочной фосфатазой (FastAP) производства ThermoFisher Scientific. Секвенирование ДНК проводили на обеих цепях с использованием набора BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) в 10 мкл смеси содержащей 1,25 секвенального буфера, 1 мкл Big Dye Terminator, 0,5 мкл каждого праймера и 0,8 мкл ПЦР продукта. Продукты секвенальной реакции были очищены спиртовой преципитацией в соответствии с протоколом к Big Dye Terminator и прочитаны с использованием автоматического капиллярного анализатора ABI 3130XL® (Applied Biosystems) на базе ДВФУ. Анализ первичных данных, а также расчет генетических дистанций выполняли в пакете программ MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Филогенетические связи реконструировали с использованием программы mrbayes 3.2.6. (Ronquist et al., 2012), предварительно установив оптимальную модель молекулярной эволюции в программе partitionfinder (Lanfear et al., 2012).

Результаты

В результате сборки и выравнивания нами получен участок мтДНК длиной 2897 пн., включающий фрагмент гена NADH-дегидрогеназы субъединицы 2 (ND2), фланкирующие тРНК участки: tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, tRNA-Tyr, а также полную последовательность гена первой субъединицы цитохромоксидазы (COI). Соотношение использованных нуклеотидов для всей выборки составило A=26,2 %; C=29,0 %; G=17,8 %; T=27,0 % и незначительно отличалось у разных рыб. Из 2897 пн. 491 сайт оказался вариабельным, большинство из которых были парсимоний-информативными – 413 сайтов. При выравнивании всех полученных локусов делеций или инсерций нуклеотидов не выявлено. Соотношение транзиций и трансверсий (R) составило 7,98. Участок гена ND2 длиной 942 пн. имел 34 несинонимичные замены, приводящие к изменению аминокислотного состава кодируемого белка. Полный ген COI оказался консервативнее и включал шесть

Таблица 1

Точки сбора использованных в работе образцов рыб

Район	Речной бассейн	N, шт	Дата сбора	Координаты (N; E)
Тугуро-Чумиканский район	Тугур	5	06.2014	53.666; 136.701
Верхнее течение р. Амур	Чита	3	08.2015	52.046; 113.464
Нижнее течение р. Амур	Дурмин	3	10.2013	48.074; 135.877
	Половинка	3	04.2014	48.273; 134.883
Бассейн оз. Ханка	Илистая	3	08.2014	43.935; 132.768
Бассейн р. Большая Уссурка	Лагерная	1	07.2014	45.794; 136.240
Северо-Восточный Сахалин	Безымянный водоток близ залива Чайво	5	06.2016	52.559; 143.311
Центрально-Западный Сахалин	Большие Танги	3	06.2013	51.254; 142.218
Центрально-Восточный Сахалин	Лангери	3	08.2013	50.384; 143.747
	Мал. Хузи	3	08.2013	50.336; 143.760
	Орловка	3	08.2013	49.753; 142.816
Южный Сахалин	Таранай	3	05.2013	46.624; 142.433
	Краснодонка	1	05.2013	46.813; 142.481
	Сухая	2	05.2013	46.807; 142.530
	Тамбовка	1	07.2013	46.372; 142.293
	Могучи	2	08.2013	46.096; 142.191
	Белая	2	06.2013	47.244; 142.765
	Тунайча	3	06.2013	46.811; 143.073
	Фирсовка	3	08.2013	47.629; 142.551
	Ольховатка	3	06.2013	46.584; 142.388
Восточное Приморье	Тихая	5	06.2016	48.020; 142.508
	Тумнин	6	09.2013	50.554; 139.414
	Соболевка	3	07.2014	46.228; 137.974
	Максимовка	2	07.2014	46.047; 137.308
	Амгу	3	07.2014	45.897; 137.539
	Кема	3	07.2014	45.672; 136.761
	Таежная	3	08.2014	45.395; 136.840
Серебрянка	3	08.2014	45.064; 136.604	
Южное Приморье	Черная	3	04.2014	43.286; 134.160
	Киевка	2	07.2013	42.982; 133.534
	Партизанская	3	08.2014	43.380; 133.426
	Суходол	3	05.2013	43.135; 132.606
	Лазурная	1	08.2013	43.204; 132.098
	Седанка	3	07.2013	43.189; 131.983
	Кедровая	3	03.2013	43.103; 131.549
	Цукановка	5	07.2015	42.750; 130.786
Чукотский автономный округ, басс. р. Колыма	Р. Каральвеем	3	08.2016	68.062; 166.414

несинонимичных замен. Среднее число попарных различий для всей выборки составило $110,69 \pm 47,85$, уровень гаплотипического разнообразия был равен 0,908.

Байесовская филограмма (рис. 1) получена нами с использованием в качестве внешней группы обыкновенного усатого гольца *Barbatula barbatula* (Linnaeus, 1758), депонированного в геномном банке под номером KP715096. Используемые в анализе рыбы сформировали на полученном дереве восемь обособленных монофилетичных клад. Выявленные клады поддержаны высокими значениями апостериорной вероятности. Значения генетических дистанций (модель Kimura 2-parameter) между выявленными кладами сведены в таблицу 2.

Первая клада объединяла рыб, собранных в большинстве точек о. Сахалин: с южной, восточной и северо-восточной частями острова (рис. 2). Внутри клады рыбы генетически однородны. Сестринской группировкой являлась клада 2, состоящая из рыб, собранных в р. Тумнин. Значения генетических дистанций (K2P) между первыми двумя кладами составили $3,0 \pm 0,3\%$ (табл. 2). Третья включает рыб из р. Тугур со средними значениями дистанций $3,9 \pm 0,3\%$ в сравнении с сахалинскими рыбами. Клада 4 состоит из рыб, собранных в восточной части Приморья, для которых сестринское положение заняли рыбы из рек

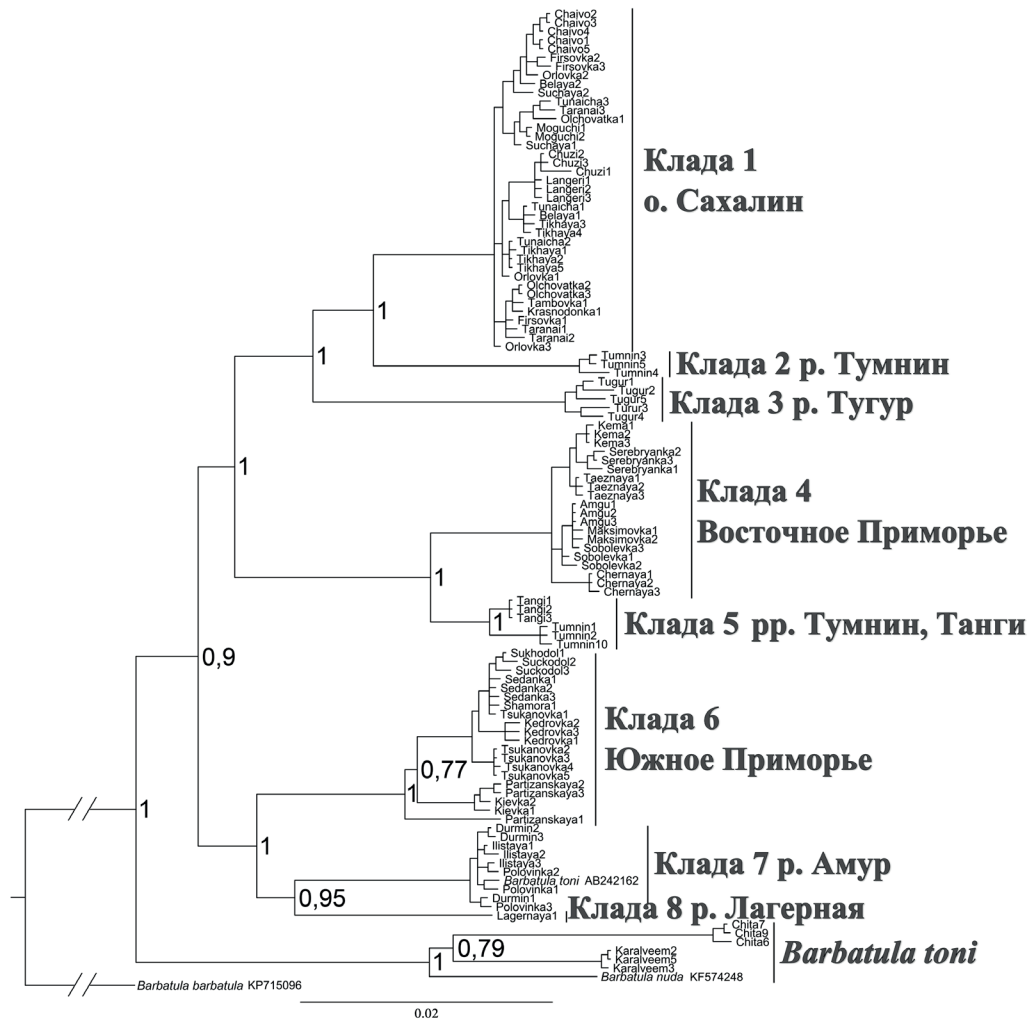


Рис. 1. Байесовская филограмма усатых гольцов Амура и сопредельных водотоков. Дерево реконструировано используя partitionfinder анализ для 2897 выровненных нуклеотидов. Значение $\ln L$ -9940,9. Апостериорная вероятность клад указана в соответствующих узлах ветвления.

Таблица 2

Значения генетических дистанций (K2P, %) между восемью кладами усатых гольцов, рассчитанные по 2897 пн. мтДНК (под диагональю) и их стандартное отклонение (над диагональю)

Клада	1	2	3	4	5	6	7	8
1 о. Сахалин		0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4
2 р. Тумнин	3,0		0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5
3 р. Тугур	3,9	4,3		0,5	0,4	0,4	0,4	0,4
4 Восточное Приморье	4,9	5,4	5,5		0,3	0,5	0,5	0,5
5 рр. Тумнин, Танги	4,0	4,7	4,6	2,2		0,5	0,4	0,5
6 Южное Приморье	4,5	5,1	5,1	5,2	4,8		0,3	0,4
7 р. Амур	4,4	5,1	4,6	5,1	4,3	3,6		0,3
8 р. Лагерная	4,5	5,0	4,9	5,4	4,9	3,5	3,3	

Тумнин+Танги. Примечательно, что в р. Тумнин обитают две самостоятельные, вероятно репродуктивно изолированные популяции рыб, дистанции между которыми составляют $4,7 \pm 0,4$ %. Клады 7 и 8 включают рыб, собранных в основном бассейне р. Амур, для которых 6 клада является сестринской и объединяет рыб из южного Приморья. Значения генетических дистанций между кладами 6 и 7 составили $3,6 \pm 0,3$ %. Базальное положение ко всем восьми выявленным кладам занял вид *B. toni* из верхнего течения р. Амур (р. Чита), бассейна р. Колыма (р. Каральвеем), а также из Китая (KF574248).

Из филограммы (рис. 1) видно, что выявленные восемь клад усатых гольцов образуют монофилетичную группу и занимают сестринское положение относительно *B. toni* из верхнего течения р. Амур (р. Чита) и бассейна р. Колыма (р. Каральвеем). Дальнейшая история этих рыб связана с обособлением группы рыб амурского бассейна (клады 7 и 8) и южного Приморья (клада 6) от рыб восточного Приморья и бассейна р. Тумнин (клады 2, 4 и 5), сахалинских и тугурских рыб (клады 1, 3).

В кладе амурских рыб (клада 7) особи оказались генетически гомогенны, несмотря на их значительную географическую удаленность, при этом рыбы южного Приморья внутри клады разделялись на две группы: рыб, населяющих реки залива Петра Великого и рыб из рек Партизанская и Киевка. Генетическая дистанция между амурскими рыбами и особью из р. Лагерная (клада 8) составила 3,5 %.

Рыбы из восточного Приморья оказались генетически гомогенны, а наименьшие дистанции эти рыбы имели с особями из клады 5, собранными в реках Тумнин и Танги (о. Сахалин). В дальнейшем от общего ствола дерева ответвились рыбы из р. Тугур (клада 3), Тумнин (клада 2) и большая часть водотоков о. Сахалин (клада 1).

Анализ последовательностей нуклеотидов из генного банка по фрагменту COI (652 пн.) показал, что к группе «*Barbatula toni*» на рисунке 1 относятся также усатые гольцы из рек Шилка (KX039652), Обь (KX039657), Енисей (KX039660), а также из Китая (KF574248, KT716379, KT716380). Для установления видовой самостоятельности изучаемой группы усатых гольцов нами выполнены расчеты генетических дистанций (K2P) по фрагменту COI, используемого для баркодинга рыб (Hebert et al. 2003; Ward et al. 2008; Varman et al., 2017) относительно гомогенной группировки *B. toni* и обыкновенного усатого гольца *B. barbatula* (KP715096). Значения дистанций между объединенной из восьми клад группировки гольцов и *B. toni* составили $6,0 \pm 1,1$ %, а от европейского усатого гольца *B. barbatula* эти рыбы отличаются на $12,4 \pm 1,8$ %. В свою очередь, *B. toni* и *B. barbatula* отличаются на $13,0 \pm 1,9$ %.

Обсуждение

Усатые гольцы в пределах амурского бассейна образуют высокое число самостоятельных, вероятно репродуктивно изолированных линий. Высокие генетические дис-

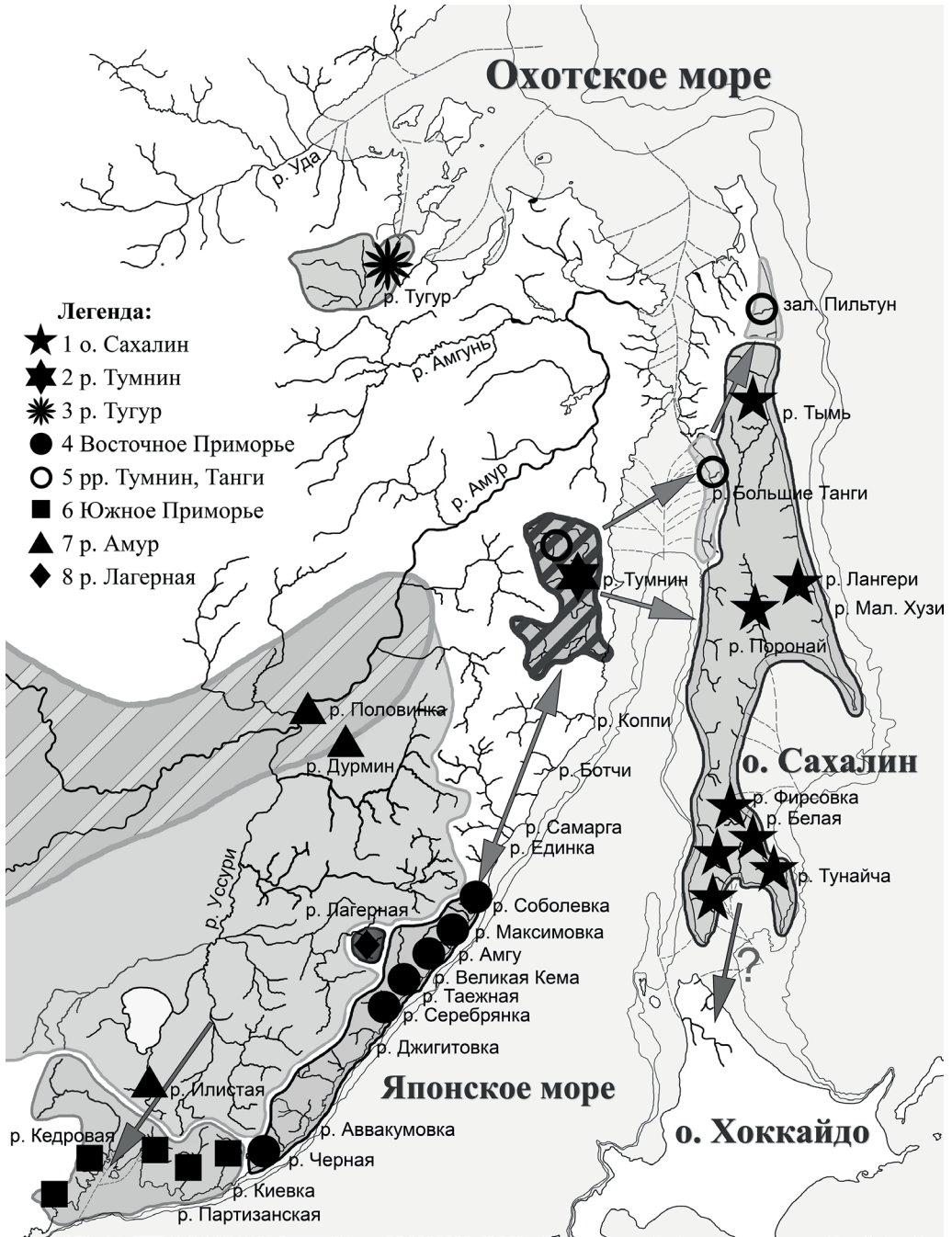


Рис. 2. Карта-схема распределения клад усатых гольцов, выявленных методом Байеса на основании молекулярных данных, в нижнем течении р. Амур и на сопредельных территориях. Условные обозначения образцов указаны в легенде. Сплошным цветом показаны предполагаемые территории различных клад, а зоны их симпатрии заштрихованы. Сплошными линиями вдоль побережья показаны 100 и 150 метровые изобаты, а пунктирными линиями обозначены русла плейстоценовых палеорек.

танции между выявленными группировками, а также широкое распространение этих рыб делают их хорошими модельными объектами для исследования биогеографии пресноводных рыб. Сходная работа была выполнена по обыкновенному усатому гольцу *B. barbatula* в реке Дунай, в бассейне которого на основании данных секвенирования гена цитохрома б мтДНК (*cyt b*) было выявлено пять высоко обособленных линий рыб (Šediva et al., 2008).

Топология полученной филограммы (рис. 1) связывает происхождение выявленных восьми клад амурских гольцов с сибирским усатым гольцом *B. toni*, который генетически относительно гомогенен на большой территории – от бассейна реки Обь до р. Колыма, а с южной стороны ограничен северным Китаем. Используя время дивергенции *B. barbatula* и *B. toni* в 18 млн. лет назад, полученное в работе А. Седива с соавторами (Šediva et al., 2008), становится возможным рассчитать скорость накопления мутаций для гена COI, которая соответствует 1,3 % за 1 млн. лет. В этом случае время обособления изучаемых амурских гольцов от *B. toni* соответствует раннему плиоцену.

Дальнейшие филогенетические события связаны с обособлением рыб восточного Приморья и о. Сахалина (клады 1–5) от амурских и южноприморских популяций (клады 6–8), что в целом согласуется с выделенными Черешневым (1998) Амурской и Приморской биогеографическими провинциями. Исключениями от такой стратификации является группа рыб из южного Приморья, которая имеет наибольшее сходство с амурскими рыбами, нежели восточно-приморскими, а также рыбы из р. Тугур, которые, по нашим данным, близки к сахалинским и тумнинским рыбам.

Обособление рыб южного Приморья (клада 6) от амурских рыб (клада 7), по-видимому, связано с эоплейстоценовым стоком р. Раздольной в бассейн озера Ханка через долину рек Абрамовки и Илистой (Короткий, 2010; Короткий и др., 2011). Связь оз. Ханка и р. Раздольной отмечал также Черешнев (1998), ссылаясь на геологические данные для объяснения сходства ихтиофаун этих двух бассейнов. Дальнейшему распространению усатых гольцов по рекам залива Петра Великого способствовали регрессии уровня моря, которые в плейстоценовую эпоху доходили до 100–120 метров от современного уровня (Худяков и др., 1972; Короткий, 2010) (рис. 2). Наиболее южной точкой в кладе 6, в которой собраны усатые гольцы, является река Цукановка (Хасанский район). К сожалению, у нас отсутствуют пробы рыб из р. Туманная, поэтому в настоящее время затруднительно точно ограничить Южноприморский район, выделенный Черешневым (1998). Невозможно также ограничить этот район от восточной части. Так, по данным Черешнева (1998), восточная граница района находится к югу от бух. Ольга, соответственно к этому району относятся бассейны рек Черная, Милоградовка и Маргаритовка. Однако, судя по распределению гаплогрупп усатых гольцов, крайняя точка распространения клады 6 находится в р. Киевка, тогда как рыбы р. Черная относятся к кладе 4 (рис. 2).

Группа южноприморских усатых гольцов генетически гетерогенна. Рыбы, собранные в реках Партизанская и Киевка имеют высокие генетические дистанции ($1,3 \pm 0,2$ %) от остальных выборок (рр. Цукановка, Кедровая, Седанка, Лазурная, Суходол). В то же время, 4 из 5 особей рыб, собранных в реках Партизанская и Киевка сходны между собой, а дистанции варьируют в диапазоне 0,03–0,24 %. Сходство рыб из рек Партизанская и Киевка, а также их высокие отличия от рыб, собранных в реках залива Петра Великого, свидетельствуют о разобщенности бассейнов двух рек от палео-Суйфуна в плейстоценовую эпоху. Такое заключение подтверждается также высокими глубинами шельфа Японского моря близ устьевых частей двух водотоков (рис. 2). Таким образом, расселению пресноводных рыб в бассейны рек Партизанская и Киевка способствовали межбассейновые перестройки речных систем (Короткий, 2010; Короткий и др., 2011), что находит подтверждение на примере бычка Волка (*Cottus volki* Taranetz, 1933), который распространен в реках Партизанская и Киевка и далее на север вплоть до р. Великая Кема, однако отсутствует в реках, впадающих в залив Петра Великого (Шедько, 2001, Шедько, Шедько, 2003). Территория от р. Партизанская до р. Маргаритовка является переходным между южноприморским и североприморским регионами.

Клада 7 состоит из рыб, собранных в низкопорядковых притоках р. Амур со значительным удалением друг от друга. Так, часть рыб собрана в р. Илистая (бассейн оз. Ханка), тогда как остальные представители этой группировки отловлены близ г. Хабаровск: в р. Половинка и р. Дурмин (бассейн р. Сита). Образец усатого гольца из генного банка, депонированный под номером АВ242162 и собранный в бассейне р. Уссури также принадлежит к кладе 7. Известно, что в среднем течении р. Амур симпатрично обитают две формы усатых гольцов (Новомодный, 2014), одна из которых находится в кладе 7, а другая обозначена на рис. 1 как *B. toni*. Такое географическое распределение групп усатых гольцов отражено на рис. 2.

В реке Лагерная (клада 8) нами отловлен усатый голец, дистанция которого от амурских рыб (клада 7) составляет $3,3 \pm 0,3$ %. Объяснением таких различий может выступать высокая удаленность водотока от основного бассейна р. Амур, который является притоком 6 порядка (Лагерная → Обильная → Арму → Большая Уссурка → Уссури → Амур). На основании полученной дистанции можно предположить наличие существенной генетической гетерогенности рыб даже в пределах бассейна р. Амур, где возможно существование множества обособленных группировок усатых гольцов в высокопорядковых притоках.

Клады 1–5 объединяются в одну монофилетичную группу рыб, обособленную от амурских усатых гольцов (рис. 1). Симпатричное обитание одновременно двух высоко обособленных популяций рыб в бассейне р. Тумнин (клады 2 и 5), а также высокое сходство тумнинских и сахалинских рыб (клады 1 и 2) позволяют предположить, что бассейн этой реки сыграл ключевую роль в обособлении восточной группировки усатых гольцов от собственно амурских рыб.

Невысокие генетические дистанции ($2,2 \pm 0,3$ %) между тумнинскими (клада 5) и восточно-приморскими (клада 4) рыбами позволяют предположить, что во всем диапазоне приморских рек от р. Соболевка на юге до р. Тумнин на севере обитают генетически сходные рыбы. Наиболее южной точкой, где нами отмечены рыбы, принадлежащие к кладе 4 является р. Черная. К сожалению, в нашем распоряжении нет образцов рыб из большого числа рек бассейна Японского моря – от р. Милоградовки на юге до р. Джигитовки на севере, что не позволяет однозначно говорить о повсеместном распространении гольцов, принадлежащих к 4 кладе в восточном Приморье.

В р. Большие Танги нами собраны и проанализированы усатые гольцы, сходные с одной из популяций рыб р. Тумнин (клада 5), между которыми дистанции составили $0,59 \pm 0,14$ %. Помимо р. Большие Танги, сходный гаплотип отмечен в генном банке под номером КТ247666, который собран близ побережья у северной оконечности залива Пильтун (координаты N 53.29, E 143.22). В то же время, в прибрежной зоне у залива Чайво обитают усатые гольцы из первой клады, дивергенция которых от пятой клады составляет $3,7 \pm 0,3$ % (табл. 2). К сожалению, мы не располагаем образцами рыб с северо-западной части острова, населенной этим видом рыб (Иванов, Иванова, 2001), где могут обитать как гольцы из клады 5, что объединяет популяции рыб из р. Большие Танги и залива Пильтун, так и из клады 2, как наиболее распространенных рыб на о. Сахалин.

Ранее было показано, что во времена плейстоценовых регрессий уровня моря, река Амур имела сток вглубь Охотского моря через нынешний Сахалинский залив и оказала влияние на пресноводную икhtiофауну северо-западной части острова, что подтверждается их сходством (Черешнев, 1998; Сафронов и др., 2001, 2003; Иванов, Иванова, 2001; и др.) (рис. 2). Генетических данных для усатых гольцов из нижнего течения р. Амур в нашем распоряжении нет, однако следуя данным Черешнева (1998), амурские усатые гольцы из клады 7, вероятно, обитают в реках северо-западного Сахалина.

Таким образом, усатые гольцы из клад 4 и 5 являются генетически близкими между собой (табл. 2) и распространены во всех реках восточного и северного Приморья, а также обитают в нескольких водотоках восточного и западного Сахалина. Точные границы ареала этих рыб неизвестны и требуют дополнительных исследований.

Собранные в реке Тугур рыбы относятся к кладе 3 на полученной филограмме. Эти рыбы занимают сестринское положение относительно сахалинских и тумнинских усатых

гольцов из клад 1 и 2. Положение на дереве этих рыб противоречит данным Черешнева (1998) по зоогеографическому районированию, согласно которым пресноводные рыбы освоили Шантарский район путем перестроек рек Тугур и Нимелен. Объяснить сходство тугурских и сахалинских рыб путем объединения бассейнов палео-Амура и палео-Уды по представлениям Линдберга (1972) затруднительно ввиду отсутствия материала по другим рекам Охотского моря к северу от бассейна р. Тугур, в диапазоне от р. Сыран на западе до р. Иска на востоке, а также по северо-западному Сахалину.

Рыбы из клады 2 обитают в р. Тумнин и занимают стретинское положение относительно клады 1, которая сосредоточена в большинстве исследованных водотоков о. Сахалин. Как уже отмечалось, в этой реке обитает две репродуктивно изолированных популяции (клады 2 и 5), распределение которых по бассейну неизвестно. Полная выборка тумнинских рыб, собранных в устьевой части р. Аты, состояла из 20 особей, для шести из которых был получен фрагмент ДНК длиной 2897 пн, включающий полноразмерные последовательности генов ND2 и COI. Однако, для разделения образцов на две группы, нами выполнен анализ всех 20 особей по короткому фрагменту гена ND2, который показал, что три особи принадлежат к кладе 5, а оставшиеся 17 относятся к кладе 2. Пластические и фенотипические отличия усатых гольцов в пределах бассейна р. Тумнин не выявлены и требуют дополнительных исследований. Таким образом, в летнее время, две популяции усатых гольцов в верхнем течении реки обитают симпатрично, а данные по их распределению в бассейне, биологии и экологии отсутствуют.

К кладе 1 относятся рыбы, собранные в большинстве локализаций о. Сахалин: от северо-восточной части (близ зал. Чайво) до центрального (бассейн р. Поронай, р. Лангери) и южного Сахалина (табл. 1). Выявленная группировка рыб относительно гомогенна (рис. 1), а генетически наиболее близкими рыбами являются усатые гольцы из р. Тумнин (клада 2). Наиболее полно представлен материал по южной части Сахалина, а сходство рыб в рр. Поронай, Мал. Хузи, Лангери и близ зал. Чайво позволяют предположить, что все реки в этом промежутке населены рыбами из клады 1. Наиболее неизученной оказалась западная часть Сахалина, которая ограничена только бассейном р. Большие Танги.

Нами установлено, что усатые гольцы дважды проникли на остров Сахалин через палео-Тумнин, который объединял в плейстоцене реки западного Сахалина и северного Приморья и стекал в южном направлении (рис. 2). Вполне возможно, рыбы из клад 2 и 5 обитают в бассейне р. Тумнин на разной высоте над уровнем моря: рыбы из клады 2 более многочисленны и обитают в нижнем, среднем и верхнем течениях реки, а рыбы из 5 клады обитают только в высокопорядковых притоках реки. Тогда, при сохранении такой стратификации, в верхних притоках палео-Тумнина обитали рыбы из клады 5, которые сохранились в р. Большие Танги. В свою очередь, большая часть острова населена нижнетумнинскими рыбами (клада 2), которые могли проникнуть в бассейны рек Тымь и Поронай через нынешние реки Агнево, Августовка или смежные с ними. Предложенная гипотеза также требует детального анализа рыб из ряда водотоков западного Сахалина и северного Приморья, включая реки Коппи и Ботчи. Вероятно, гольцы из клады 2 обитают также в реках о. Хоккайдо, однако для этих рыб получена только контрольная область мтДНК (Miyazaki et al., 2011), поэтому их сравнение невозможно.

Таксономический статус амурских усатых гольцов не ясен и обсуждается в литературе. Некоторые авторы полагают, что в бассейне Амура обитает два самостоятельных вида (Bogutskaya et al., 2008; Новомодный, 2014). Первый вид является сибирским усатым гольцом *B. toni*, описанным Дыбовским (1867) из верхнего течения р. Амур. Второй вид обозначен как *B. sp.* (Bogutskaya et al., 2008) или *B. nudus* (Новомодный, 2014).

Богуцкая с соавторами (Bogutskaya et al., 2008) приводит для *B. toni* (Dybowski, 1869) широкий ареал: от бассейна реки Обь до р. Колыма в Арктике и вплоть до реки Хуанхэ в бассейне Тихого океана. Этот же вид обитает от верховьев до нижнего течения р. Амур. Ряд авторов сводят в синонимы этот вид с *B. nuda* (Bleeker, 1864), ареал которого ограничен северным Китаем, Корейским полуостровом и Японией (Kottelat, 2006; Cao et

al., 2012; Eschmeyer, Fricke, 2017). Второй вид *B. sp.*, по данным Богуцкой с соавторами (Bogutskaya et al., 2008), обитает в бассейне р. Амур, в том числе и в бассейне оз. Ханка. От первого вида он отличим по вытянутым пятнам на спинном и хвостовом плавнике, которые образуют 2–3 поперечные полосы.

По мнению Новомодного (2014), в нижнем течении Амура симпатрично обитают по меньшей мере два вида усатых голецов. Первый, «круглохвостый» усатый голец отмечен как *B. nudus* (Bleeker, 1864) населяет реки полугорного типа с галечниковым дном, предпочитает жить в медленно текущих протоках и старицах в зарослях водной растительности на глубинах более полуметра. *B. nudus* отличим от вида *B. toni* по короткому закругленному рыльцу и выпуклым краем хвостового плавника. Соответственно, *B. toni* имеет заостренное рыльце, хвостовой плавник в расправленном состоянии имеет ровный край, а в сложенном состоянии вогнутый. Населяет реки полугорного типа с галечниковым дном, предпочитая небольшие глубины основного русла рек. В нижнем течении Амура встречается намного реже круглохвостой формы.

Приведенные авторами признаки двух форм и фотографии рыб позволяют предположить, что *B. sp.* (по: Bogutskaya et al., 2008) соответствует *B. nudus* (по: Новомодный, 2014). Описание вида *B. toni* и приведенные фотографии у двух авторов довольно сходны и соответствуют описаниям типовых экземпляров этого вида.

Прокофьев (2003) считает, что все усатые голецы могут быть разделены на три подвиды в пределах одного вида *Barbatula (=Orthrias) barbatulus*: *O. b. barbatulus*, обитающий в Европейской части ареала, *O. b. sturanyi* в Охридском озере (Балканы) и *O. b. toni* в Сибири и на Дальнем Востоке. Оснований для дробления *O. b. toni* на ряд самостоятельных форм, по мнению автора, нет. В то же время, отмечается, что в водоемах Тувы и Монголии обитают самостоятельные виды, степень морфологических отличий которых достаточна для выделения самостоятельных видов.

Отмеченный Новомодным (2014) признак в виде «тупого» и «острого» рыла усатых голецов обсуждается также в работе Прокофьева (2014). Острорылая форма (*B. toni* по: Новомодный, 2014) отличается прогонистым телом и вырезанным хвостовым плавником, а также редуцированным (часто до полного отсутствия) чешуйным покровом и довольно светлой окраской со слабо выраженным рисунком. По мнению автора, «острорылая» форма должна быть отнесена к виду *B. tomiana*, который обсуждается в работе Котелла (Kottelat, 2012). В свою очередь, при установлении их видовой самостоятельности, тупорылая форма должна получить статус *B. compressirostris*. Однако, в качестве результирующей части, автор предлагает не выделять отдельные самостоятельные от *B. toni* виды, а считать их одним общим политипическим видом *B. toni*.

Анализ отловленных в рамках настоящей работы рыб показал, что все особи рыб из выявленных восьми клад имели признаки *B. nudus* (по: Новомодный, 2014), или «тупорылый» морфотип (по: Прокофьев, 2014) – округлый хвостовой плавник и закругленное рыльце (рис. 3). В свою очередь, проанализированные нами рыбы из рр. Чита и Каральвеем (басс. р. Колыма) имели признаки *B. toni* (по: Новомодный, 2014) или «острорылый»



Рис. 3. Усатый голец из р. Чита с выемчатым хвостом и заостренным рылом (фото Е.П. Горлачевой).



Рис. 4. Усатый голец из р. Амгу (клада 4) с округлым хвостом закругленным рылом (фото А.А. Семенченко).

морфотип (по: Прокофьев, 2014): выемчатый хвостовой плавник и заостренное рыло (рис. 4) и заняли базальное положение на дереве (рис. 1).

Генетические дистанции между читинскими рыбами с выемчатым хвостом и «круглохвостыми» формами из нижнего течения р. Амур и сопредельных водотоков составили $6,0 \pm 1,1$ %, в то время как европейский и сибирский усатые голец отличаются на $13,0 \pm 1,9$ %. Судя по литературным данным, отличий в 6,0 % для этой группы рыб недостаточно для обоснования видовой самостоятельности двух форм. Так, Кнебельсбергер (Knebelberger et al., 2014) показал, что максимальные внутривидовые отличия для *B. barbatus* на территории Германии превышают генетические дистанции в 7 % (K2P). В то же время, значение, превышающее 8 % (K2P) приводится как достаточное для описания видов рода *Eidinemacheilus* (Nemacheilidae). Обособление вида рода *Schistura* из того же семейства было выполнено на основании 16,88 % генетической дифференциации (Barman et al., 2017).

Предложенный Хебертом (Hebert et al., 2003) подход для обоснования межвидовых дистанций по COI мтДНК заключается в их десятикратном превышении внутривидовых отличий, что составляет люфт между этими значениями (barcoding gap). Максимальные внутривидовые отличия, выявленные нами, составили $5,5 \pm 0,5$ % (табл. 2), поэтому используя правило Хеберта можно предположить необходимость использования значения близкого к 15 % (K2P) для обоснования видовой самостоятельности тех или иных форм в пределах рода *Barbatula*.

Благодарности

Авторы глубоко признательны С.Ф. Золотухину и А.Н. Канзепаровой за сборы рыб в реках Хабаровского края; С.С. Макееву и О.Д. Прокопенко за сборы рыб на о. Сахалин; П.А. Савельеву и Е.М. Минько за сборы рыб в Приморском крае; Е.П. Горлачевой за сборы и фотографии рыб р. Чита; Н.М. Яворской за сборы рыб р. Половинка.

Литература

- Богатов В.В., Storozhenko С.Ю., Баркалов В.Ю., Холин С.К., Макаренко Е.А., Прозорова Л.А. 2007. Биогеография острова Сахалин на примере распространения наземной и пресноводной биоты // Теоретические и практические проблемы изучения сообществ беспозвоночных: памяти Я.И. Старобогатова. Москва. С. 193–224.
- Горлачева Е.П. 2014. Питание и трофические взаимоотношения рыб в реке Унда (Забайкальский край) // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 6. Владивосток: Дальнаука. С. 159–164.
- Иванов А.Н., Иванова Л.В. 2001. О составе и зоогеографическом районировании ихтиофауны пресных вод северо-западного Сахалина // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 1. Владивосток: Дальнаука. С. 250–263.
- Короткий А.М. 2010. Перестройки речной сети в Приморье: причины, механизмы и влияние на геоморфологические процессы // Геоморфология. Вып. 2. С. 78–91.
- Короткий А.М., Коробов В.В., Скрыльник Г.П. 2011. Аномальные природные процессы и их влияние на состояние геосистем юга Российского Дальнего Востока. Владивосток: Дальнаука. 265 с.

- Линдберг Г.У. 1972. Крупные колебания уровня океана в четвертичный период: биогеографические обоснования гипотезы. Ленинград: Наука. 548 с.
- Новомодный Г.В. 2014. Рыбы Амура у Хабаровска. Воронеж: Лайт. 92 с.
- Прокофьев А.М. 2003. Материалы к ревизии усатых голецов (Balitoridae: Nemacheilinae: Orthrias Jordan et Fowler, 1903) Монголии и сопредельных территорий. I. Два новых вида из водоемов Тувы и Монголии // Вопр. ихтиологии. Т. 43, № 6. С. 725–738.
- Прокофьев А.М. 2014. Рецензия на книгу М. Котелла «Conspectus cobitidum: Инвентаризация вьюнов мира (Teleostei: cypriniformes: cobitoidei)» // Вопр. ихтиологии. Т. 54 № 2. С. 243–248.
- Сафронов С.Н., Жульков А.И., Никитин В.Д. 2001. Распространение и биология амурского хариуса (*Thymallus grubii* Dybowski, 1869) на Сахалине // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 1. Владивосток: Дальнаука. С. 269–276.
- Сафронов С.Н., Жульков А.И., Никитин В.Д., Лежинский С.Н. 2003. Таксономическое положение хариуса (род *Thymallus*) Сахалина и правобережных притоков Нижнего Амура // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 2. Владивосток: Дальнаука. С. 355–367.
- Семенченко А.Ю. 2001. Фауна и структура рыбных сообществ в ритрали рек Приморья // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 1. Владивосток: Дальнаука. С. 217–228.
- Худяков Г.И., Кулаков А.П., Короткий А.М. 1972. О развитии речной сети в южной части советского Дальнего Востока. // Юг Дальнего Востока. История развития рельефа Сибири и Дальнего Востока. М.: Наука. С. 339–365.
- Черешнев И.А. 1998. Биогеография пресноводных рыб Дальнего Востока России. Владивосток: Дальнаука. 131 с.
- Шедько С.В. 2001. Список круглоротых и рыб пресных вод побережья Приморья // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 1. Владивосток: Дальнаука. С. 229–249.
- Шедько С.В., Шедько М.Б. 2003. Новые данные по пресноводной ихтиофауне юга Дальнего Востока России // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 2. Владивосток: Дальнаука. С. 319–336.
- Avise J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge: Harvard University Press. 447 p.
- Barman A.S., Singh M., Pandey P.K. 2017. DNA barcoding and genetic diversity analyses of fishes of Kaladan River of Indo-Myanmar biodiversity hotspot // Mitochondrial DNA A DNA Mapp. Seq. Anal. V. 16. P. 1–12.
- Bogutskaya N.G., Naseka A.M., Shedko S.V., Vasil'eva E.D., Cheresnev I.A. 2008. The fishes of the Amur River: updated check-list and zoogeography // Ichthyol. Explor. Freshwaters. V. 19, N4. P. 301–366.
- Cao L., Causse R., Zhang E. 2012. Revision of the loach species *Barbatula nuda* (Bleeker 1865) (Pisces: Balitoridae) from North China, with a description of a new species from Inner Mongolia // Zootaxa № 3586. P. 236–248.
- Eschmeyer W.N., Fricke R. 2017. Catalog of Fish. Updated internet version of 31 May 2017 [Electronic resource]. Catalog databases of CAS cited in FishBase. Режим доступа: <http://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>
- Froufe E., Knizhin I., Koskinen M.T., Primmer C.R., Weiss S. 2003. Identification of reproductively isolated lineages of Amur grayling (*Thymallus grubii* Dybowski 1869): concordance between phenotypic and genetic variation // Mol. Ecol. V. 12. P. 2345–2355.
- Froufe E., Alekseyev S., Alexandrino P., Weiss S. 2008. The evolutionary history of sharp- and blunt-snouted lenok (*Brachymystax lenok* (Pallas, 1773)) and its implications for the paleohydrological history of Siberia // BMC Evolutionary Biology. V. 8(1). P. 1–40.
- Geiger M.F., Herder F., Monaghan M.T., Almada V., Barbieri R., Bariche M., Berrebi P., Bohlen J., Casal-Lopez M., Delmastro G.B., Denys G.P., Dettai A., Doadrio I., Kalogianni E., Kärst H., Kottelat M., Kovačič M., Laporte M., Lorenzoni M., Marčić Z., Özulug M., Perdices A., Perea S., Persat H., Porcelotti S., Puzzi C., Robalo J., Šanda R., Schneider M., Šlechtová V., Stouboudi M., Walter S., Freyhof J. 2014. Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes // Molecular Ecology Resources. V. 14, N 6. P. 1210–1221.
- Hebert P.D., Ratnasingham S., deWard J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. V. 270, Suppl. 1. S. 96–99.
- Kneibelsberger T., Andreas R., Neumann D., Geiger M.F. 2014. Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding // Molecular Ecology Resources. V. 15(3). P. 562–572.
- Kottelat M. 2006. Fishes of Mongolia. A checklist of fishes known to occur in Mongolia with comments on systematic and nomenclature. Washington: The World Bank. 103 p.
- Kottelat M. 2012. Conspectus cobitidum: an inventory of the loaches of the World (Teleostei: Cypriniformes: Cobitoidei) // Raffles Bull. Zool. Suppl. V. 26. 199 p.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol. Biol. Evol. V. 33, N 7. P. 1870–1874.
- Lanfear R., Calcott B., Ho S.Y., Guindon S. 2012. Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses // Mol. Biol. Evol. V. 29, N 6. P. 1695–1701.
- Miyazaki J., Dobashi M., Tamura T., Beppu S., Sakai T., Mihara M., Hosoya K. 2011. Parallel evolution in eight-barbel loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes) revealed by mitochondrial and nuclear DNA phylogenies // Molecular Phylogenetics and Evolution. V. 60, N 3. P. 416–427.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // Syst. Biol. V. 61. P. 539–542.

- Šediva A., Janko K., Šlechtova V., Kotlik P., Simonovic P., Delic A., Vassilev M. 2008. Around or across the Carpathians: colonization model of the Danube basin inferred from genetic diversification of stone loach (*Barbatula barbatula*) populations // *Molecular Ecology*. V. 17, N 5. P. 1277–1292.
- Sember A., Bohlen J., Slechtova V., Altmanova M., Symonova R., Rab P. 2015. Karyotype differentiation in 19 species of river loach fishes (Nemacheilidae, Teleostei): extensive variability associated with rDNA and heterochromatin distribution and its phylogenetic and ecological interpretation // *J. BMC Evol. Biol.* V. 15, N 251. P. 1–22.
- Shedko S.V., Miroshnichenko I.L., Nemkova G.A. 2008. On the systematics and phylogeography of eight-barbel loaches of the genus *Lefua* (Cobitoidea: Nemacheilidae) mtDNA typing of *L. pleskei* // *Russ. J. Genet.* V. 44. P. 817–825.
- Vlach P., Dušek J., Švátorá M., Moravec P. 2005. Fish assemblage structure, habitat and microhabitat preference of five fish species in a small stream // *Folia Zoologica*. V. 54, N 4. P. 421–431.
- Wang Y., Shen Y., Feng C., Zhao K., Song Z., Zhang Y., Yang L., He S. 2016. Mitogenomic perspectives on the origin of Tibetan loaches and their adaptation to high altitude // *Nature*. V. 6. N 29690.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species // *Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci.* V. 360. P. 1847–1857.