

УДК 575.17:597.554.3

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ СЕРЕБРЯНЫХ КАРАСЕЙ *Carassius auratus gibelio* И *C. auratus cuvieri*, ЗОЛОТОГО КАРАСЯ *C. carassius* И КАРПА *Cyprinus carpio* НА ОСНОВЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

© 2011 г. О. В. Апаликова<sup>1</sup>, А. В. Подлесных<sup>1</sup>, А. Д. Кухлевский<sup>1,2</sup>, С. Гохуа<sup>3</sup>, Вл. А. Брыков<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, Владивосток 690041

e-mail: ovapal@yahoo.com, vlbrykov@mail.ru

<sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет, кафедра генетики, Владивосток 690600<sup>3</sup> Marine Fisheries Research Institute of Shandong, 264006, China

Поступила в редакцию 29.07.2009 г.

На основе данных ПЦР-ПДФ-анализа участков ND3/ND4L/ND4 и 12S/16S рНК и данных по изменчивости нуклеотидной последовательности гена цитохрома *b* проанализирована дивергенция мтДНК у представителей семейства Cyprinidae для выяснения филогенетических отношений между видами карасей, а также для возможного решения проблемы их таксономического статуса. Полученные данные дают основание полагать, что предковая форма золотого и серебряного карасей разделилась на два вида после отделения от линии карпа. Позднее дивергировали материковый вид (*Carassius auratus gibelio*) и вид Японских островов (*C. auratus cuvieri*). В материковых популяциях *C. auratus gibelio* выявлены “следы” дивергентной эволюции, что проявляется в наличии двух хорошо различающихся филогрупп мтДНК. Возможно, что разделение связано с формированием в прошлом форм серебряного карася, различающихся типами размножения: триплоидной гиногенетической и диплоидной гонохорической. В то же время полученные данные подтверждают высокую вероятность генетического обмена между формами в настоящее время. Эти данные, наряду с высоким морфологическим сходством, не позволяют рассматривать эти формы как отдельные виды.

Полиплоидия играет важную роль в эволюции [1]. Этот процесс происходил независимо и многократно в различных группах рыб [2]. Полиплоидия имеет прямую взаимосвязь с явлениями гибридизации и однополого размножения [3–9]. Существует предположение, что роды *Carassius* и *Cyprinus* (семейство Cyprinidae) произошли от единого тетраплоидного предка, и со временем у большинства видов геномы стабилизировались в диплоидном состоянии [10]. Среди видов, относящихся к родам *Carassius* и *Cyprinus*, встречаются бисексуальные виды с числом хромосом, соответствующим тетраплоидам ( $2n = 100$ ), при этом в действительности являющиеся диплоидами. К таким видам относятся золотой карась *Carassius carassius*, сазан (камп) *Cyprinus carpio* и некоторые другие.

Род *Carassius* включает в себя морфологически четко различающиеся виды *Carassius carassius* (обыкновенный или золотой карась) и *Carassius auratus* (серебряный карась). Золотой карась обитает в заболоченных, заросших водоемах, пойменных озерах Северной и Восточной Европы, а также Сибири. Ареал серебряного карася шире, он включает в себя Восточную Европу, Сибирь, Дальний Восток, Сахалин, бассейны крупнейших

рек Средней Азии Сырдарья и Амударья, Корею и Китай, а также Японию [11].

До недавнего времени по ряду морфологических признаков в пределах вида *Carassius auratus* признавали существование семи подвидов *C. auratus* [11, 12]: *C. a. auratus* L., или китайский серебряный карась, широко распространенный в водах Китая, он же родоначальник всех аквариумных золотых рыбок; *C. a. gibelio*, широко распространенный в водах России и Северного Китая; пять подвидов японских карасей (*C. a. grandoculis* Temm. et Schl., *C. a. auratus* subsp., *C. a. langsdorfi* Temm et Schl., *C. a. cuvieri* Temm. et Schl., *C. a. buergeri* Temm. et Schl.) [13].

Помимо морфологических различий и различий в ареалах между золотым карасем и серебряным есть еще одно существенное различие. Если золотой карась является типичным для подавляющего большинства позвоночных диплоидным видом ( $2n = 100$ ), то для серебряного карася характерно существование двух форм с различными типами репродукции: гонохории и гиногенеза, при этом формы различаются уровнем пloidности [14]. У бисексуальной формы в диплоидном наборе содержится 100 хромосом, а у гиногенетической обнаружен как триплоидный, так и тетрап-

Таблица 1. Места сбора материала и пробы, используемые для ПДРФ-анализа мтДНК

№	Локализация, год	Виды, входящие в состав выборки	Кол-во проб	Гаплотипы	Плоидность <i>Carassius auratus gibelio</i>
1	р. Камчатка, п-ов Камчатка, Дальний Восток, Россия, 2004	<i>Carassius auratus gibelio</i>	29	H	2n
2	оз. Безымянное, о. Сахалин, Дальний Восток, Россия, 2006	<i>C. auratus gibelio</i>	50	A, H	2n, 3n
3	Озеро б/н около г. Дальнегорска, Приморский край, Дальний Восток, Россия, 2006	<i>C. auratus gibelio</i>	2	A	3n
4	р. Раздольная, Приморский край, Дальний Восток, Россия, 2003, 2006	<i>C. auratus gibelio</i>	52	A, H	2n, 3n
5	р. Амур, Дальний Восток, Россия, 2005	<i>C. auratus gibelio</i> (27), <i>Cyprinus carpio</i> (3)	30	A, K***, L***, M***	2n, 3n
6	оз. Ханка, Приморский край, Дальний Восток, Россия, 2006	<i>Carassius auratus gibelio</i>	20	A, B, F	2n, 3n
7	Iijima, Nasama, Tome Miyagi, Moguri Pumping Site, Japan, 2008	<i>C. auratus cuvieri</i>	4	I*	2n
8	Yantai, China, 2008	<i>C. auratus gibelio</i>	9	A	3n
9	р. Сырдарья, Узбекистан, 2006	<i>C. auratus gibelio</i>	20	A, B, C, D, E	2n, 3n
10	Рыбинское водохранилище, Россия, 2007	<i>C. auratus gibelio</i> (34), <i>Carassius carassius</i> (2)	36	A, G, J**	2n, 3n
11	р. Туманган, 2004, 2007	<i>C. auratus gibelio</i>	64	A, B, H	2n, 3n

\* Гаплотип *C. auratus cuvieri*.  
 \*\* Гаплотип *Carassius carassius*.  
 \*\*\* Гаплотипы *Cyprinus carpio*.

лоидный набор хромосом ( $3n \approx 150$  и  $4n \approx 200$ ) [15]. По ныне существующей номенклатуре перечисленные выше подвиды серебряного карася рассматриваются в качестве самостоятельных видов: *Carassius langsdorfi*, *C. grandoculis*, *C. buergeri*, *C. cuvieri* и *C. auratus* subsp., *C. gibelio*, хотя до настоящего времени таксономический статус серебряного карася остается открытым для дискуссии [13, 16]. Это связано в первую очередь с тем, что у большинства из них обнаружены обе формы, как диплоидная, так и полиплоидная. Исключение составляют *Carassius auratus* subsp. и *C. grandoculis*, у которых гиногенетических форм не выявлено. Данные о существовании триплоидной формы у *Carassius cuvieri* представляются противоречивыми [17].

Результаты кариологических [15, 18–21] и биохимических (аллозимных) исследований [22–24] свидетельствуют о сложной генетической природе серебряных карасей. До настоящего времени вопрос о происхождении гиногенетической полиплоидной формы остается неразрешенным [13, 16, 23]. Поскольку эта форма обнаружена у нескольких подвидов серебряного карася, предположение о едином механизме ее появления представляется не до конца обоснованным. Одним из наиболее вероятных механизмов образования триплоидной формы у серебряных карасей представляется гибридогенез, но в этом случае

остается вопрос о родительских видах, которые дали начало гиногенетической форме. Остается неизвестным, один вид или два вида участвовали в формировании полиплоидной гиногенетической формы серебряного карася [25–27]. Целью данной работы является выяснение филогенетических отношений между видами карасей на основе анализа межвидовой и внутривидовой изменчивости мтДНК. Особенности эволюции митохондриальной ДНК таковы, что в результате случайных процессов либо отбора виды и генетически изолированные дивергировавшие внутривидовые единицы формируют отдельные, хорошо различающиеся филогруппы мтДНК.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Сбор материала и выделение ДНК.* Биологический материал для проведения цитологического анализа на плоидность и анализа изменчивости митохондриальной ДНК серебряных карасей *Carassius auratus gibelio* (Bloch) и *C. auratus cuvieri*, золотого карася *Carassius carassius* и сазана *Cyprinus carpio* был собран в период экспедиционных работ с 2001 по 2009 г. в водоемах Приморья, Камчатки, Хабаровского края, Узбекистана, европейской части России, Китая и Японии (табл. 1, рис. 1). Тотальную ДНК выделяли по стандартной методике [28].



Рис. 1. Карта мест сбора проб.

**Амплификация ДНК.** Для амплификации двух участков митохондриальной ДНК использованы две пары олигонуклеотидных праймеров: для участка ND3/ND4L/ND4 5'-CACGGCCCCCT-TATGACA-3' и 5'-TGGGACAAAAATTAGGGAG-TAGTG-3', для 12S/16S рРНК 5'-CTACCCGGG-GACGAGGAG-3' и 5'-ATAGCGGCTGCAC-CATTAGG-3'.

ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 единицы *Taq* ДНК-полимеразы, 5 мкл 10 × *Taq*-буфера ("Сибэнзим"), 2 mM каждого dNTP, 0.25 мкМ каждого праймера и около 150 нг тотальной ДНК.

Условия проведения полимеразной цепной реакции следующие: предварительная денатурация при 94°C (5 мин), затем 35 циклов, включающих денатурацию цепей при 94°C (0.5 мин), отжиг праймеров при 54°C (для фрагмента мтДНК ND3/ND4L/ND4) либо при 56°C (для 12S/16S рРНК) (1 мин) и элонгацию при 72°C (2.4 мин), далее в течение 4 мин следует заключительный цикл при 68°C. Результаты ПЦР проверялись с помощью электрофореза в 1%-ной агарозе на 50 mM трис-боратном буфере. Детекция ДНК проводилась в проходящем ультрафиолетовом свете после окрашивания геля бромистым этидием [28].

**Электрофоретический анализ фрагментов рестрикции амплифицированных участков мтДНК.** Каждый из амплифицированных участков анализировался набором рестрикционных ферментов. Для исследования участка ND3/ND4L/ND4 были использованы эндонуклеазы *AvaI*, *BsuRI*, *Cfr13I*, *FnuDII*, *Hin6I*, *HinI*, *MspI*, *MvaI*; для

12S/16S rRNA – *AvaI*, *BsuRI*, *Cfr13I*, *FnuDII*, *HinI*, *MspI*, *MvaI*, *RsaI* ("Fermentas", Литва и "Сибэнзим", Новосибирск).

После обработки амплифицированных фрагментов рестриктазами пробы подвергали электрофорезу в 1.8%-ном агарозном геле в 50 mM трис-боратном буфере [28]. Фрагменты ДНК в геле окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения молекулярной массы образующихся фрагментов использовали маркерный набор фрагментов ДНК, кратных 100 пн (BRL Gibco, Grand NY), и ДНК фага, обработанную *PstI* рестриктазой.

**Анализ полиморфизма длины фрагментов рестрикции.** На основе линейного расположения рестрицированных фрагментов строились карты сайтов рестрикции по каждой эндонуклеазе для обоих амплифицированных участков мтДНК. По выстроенным картам определяли отсутствие или наличие сайта рестрикции. Варианты, отличающиеся по наличию либо отсутствию сайтов рестрикции, обусловленных мутациями, в каждом из участков по каждому из ферментов рестрикции обозначались буквой. Варианты расщепления по каждому фрагменту и по каждому ферменту кодировались в бинарной системе. Наличие сайта рестрикции обозначалось цифрой 1, отсутствие сайта рестрикции – 0. Результаты анализа двух участков мтДНК каждой особи по всем сайтам и всем рестрикционным ферментам объединяли, получая, таким образом, комбинированные гаплотипы, каждый из которых обозначался одной буквой (табл. 2). Общее число сайтов рестрикции составило 104, из которых 64 были полиморфными.

Таблица 2. Комбинированные гаплотипы исследованных видов

Гаплогруппа	Вид	ND3/ND4								12S/16S rRNA							
		AvaI	BsuRI	Cfr13I	FnuDII	Hin6I	HinfI	MspI	MvaI	AvaI	BsuRI	Cfr13I	FnuDII	HinfI	MspI	MvaI	RsaI
A	<i>C. a. gibelio</i>	A	A	B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A
B	»	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A
C	»	A	A	B	A	A	B	A	C	A	C	A	A	A	A	A	A
D	»	A	C	C	A	A	B	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A
E	»	A	D	B	A	A	B	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A
F	»	A	A	B	A	A	A	B	E	A	A	A	A	A	A	B	A
G	»	A	A	B	A	A	A	B	D	A	A	A	A	A	A	A	A
H	»	A	B	B	A	A	B	C	B	A	A	B	A	A	B	A	B
I	<i>C. a. cuvieri</i>	A	E	B	B	B	C	D	G	A	A	C	A	A	B	B	A
J	<i>C. carassius</i>	B	F	A	C	C	D	E	C	A	B	C	A	A	B	C	A
K	<i>Cyprinus carpio</i>	A	G	A	D	D	E	F	F	A	A	D	A	A	C	C	C
L	»	A	G	A	D	D	E	F	F	A	A	E	A	A	C	C	C
M	»	A	H	A	D	D	E	F	F	A	A	D	A	A	C	C	C

Таблица 3. Матрица расстояний между гаплотипами по данным ПДРФ-анализа (обозначения гаплотипов см. в табл. 1)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
A	0.000												
B	0.004	0.000											
C	0.009	0.009	0.000										
D	0.013	0.013	0.007	0.000									
E	0.015	0.015	0.009	0.013	0.000								
F	0.008	0.007	0.017	0.020	0.022	0.000							
G	0.002	0.005	0.010	0.015	0.016	0.010	0.000						
H	0.028	0.029	0.023	0.026	0.025	0.036	0.030	0.000					
I	0.037	0.033	0.035	0.039	0.037	0.040	0.034	0.026	0.000				
J	0.065	0.067	0.069	0.074	0.067	0.069	0.067	0.064	0.059	0.000			
K	0.068	0.068	0.075	0.080	0.073	0.071	0.069	0.070	0.066	0.050	0.000		
L	0.069	0.070	0.077	0.082	0.075	0.073	0.071	0.072	0.067	0.052	0.002	0.000	
M	0.069	0.070	0.077	0.082	0.075	0.073	0.071	0.072	0.068	0.052	0.002	0.003	0.000

Гаплотипическое (*h*) и нуклеотидное разнообразие (*π*), степень дивергенции между гаплотипами (*p*) определялись с помощью уравнений Nei [29] с использованием пакета программ REAP [30]. Полученная в REAP матрица количественных значений дивергенции между гаплотипами использовалась для кластеризации и построения фенограммы с использованием программы UPGMA (пакет программ NTSYS [31]) (табл. 3).

Определение нуклеотидных последовательностей во фрагменте гена цитохрома *b*. Фрагмент

последовательности гена *cytb* амплифицировали в 12.5 мкл реакционной смеси, состоящей из 1.25 мкл 10 × ПЦР буфера (750 мМ Tris–HCl (pH 8.8), 200 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1.25 мкл 10 мМ смеси dNTP (2.5 мМ каждого), 1.25 мкл 2.5 мкМ каждого праймера, 1.25 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 нг ДНК и 1 ед. *Taq* ДНК-полимеразы. Использовали праймеры FishCytB-F 5'-ACC ACC GTT GTT ATT CAA CTA CAA GAA C-3' и THR-Fish-R 5'-ACC TCC GAT CTT CGG ATT ACA AGA CC-3'. Условия ПЦР для гена *cytb* были следующими: 94°C – 3 мин, последующие

**Таблица 4.** Представители рода *Carassius*, используемые для анализа последовательностей гена цитохрома *b*

№ выборки	Виды и подвиды	Плоидность <i>C. auratus gibelio</i>	Код в NCBI/GenBank	Порядковый номер (см. табл. 5)
1	<i>C. auratus gibelio</i>	2n	FJ822044	4
2	<i>C. auratus gibelio</i>	2n	FJ478015	11
			FJ478016	12
3	<i>C. auratus gibelio</i>	3n	FJ478019	15
4	<i>C. auratus gibelio</i>	3n	FJ478018	5
		2n	FJ478017	13
			FJ822045	14
5	<i>Cyprinus carpio</i>		FJ478020	16
6	<i>C. auratus gibelio</i>	3n	FJ478022	1
		4n	FJ822041	17
7	<i>C. auratus cuvieri</i>		FJ822042	2
			FJ822043	3
8	<i>C. auratus gibelio</i>	3n	FJ822046	6
		3n	FJ822047	7
		3n	FJ822048	8
10	<i>C. auratus gibelio</i>	2–3n	FJ478012	9
10	<i>Carassius carassius</i>		FJ478014	10

35 циклов 94°C – 30 с, 57°C – 30 с, 72°C – 1 мин 30 с и финальный цикл 68°C – 5 мин. Чистоту и размеры продуктов реакции определяли в 1%-ном агарозном геле.

Очищенные продукты амплификации секвенировали, используя набор реактивов Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”). Последовательности ДНК определяли на секвенаторе ABI Prism 3130. Полученные прямые и обратные секвенальные продукты для каждого образца выравнивали с помощью программы SeqScape v2.5 (“Applied Biosystems”). Полученные фрагменты последовательностей генов *cytb* депонировали в генетическом банке данных (NCBI/GenBank) (табл. 4). Выравнивание последовательностей выполняли с использованием алгоритма ClustalW. Конечная длина последовательностей *cytb* составила 765 пн, из них 76 (9.9%) переменных и 92 (12.0%) парсимонийно информативных сайтов. Оптимальную модель нуклеотидного замещения рассчитывали в Modeltest 3.7 [32]. Филогенетические деревья строили методами максимальной парсимонии (MP) и Байесовского максимального правдоподобия (BI) с помощью программ RAUP 4.0 b 10 [33] и MrBayes v. 3.1.2 [34], соответственно. В последнем случае использовали модель нуклеотидного замещения

HKY + G ( $k = 4$ ), MCMC параметры: 1 100 000 генераций, дискретизация каждые 200 генераций. Устойчивость полученных филогенетических деревьев оценивали методом бутстрепа [35], используя 1000 бутстреп-реplik (для MP дерева).

#### Анализ уровня плоидности особей серебряного карася

**Определение площади ядер эритроцитов.** Измерения площади ядер эритроцитов проводили на препаратах крови из хвостовой артерии рыб [36]. Препараты анализировали на микроскопе Leica DM2500 при увеличении  $\times 100$ .

Для определения плоидности каждой особи строился график распределения частот площадей ядер эритроцитов, выраженных в условных единицах (пикселях) [37].

**Подсчет количества ядрышек в ядрах эритроцитов.** В качестве дополнительного метода для определения плоидности особей серебряного карася был использован метод определения количества ядрышек в ядрах эритроцитов на препаратах крови, окрашенных 50%-ным  $\text{AgNO}_3$  [38]. Количество ядрышек в клеточных ядрах, указывающее на уровень плоидности [39], анализировали статистически. У диплоидных особей соотношение

количества ядер, в которых ядрышко не визуализируется, ядер с одним ядрышком и ядер с двумя ядрышками составляет около 10% : 60% : 30%, соответственно. У некоторых диплоидных особей, относящихся как к первой, так и ко второй филогруппе мтДНК, наблюдается некоторое количество эритроцитов (до 5%), в ядрах которых визуализируются три ядрышка. У триплоидов соотношение клеток с одним, двумя и тремя ядрышками составило приблизительно 30% : 40% : 40%, соответственно, а у тетраплоидных особей это соотношение было смещено в сторону клеток с тремя и более ядрышками и составило около 10% : 30% : 40% : 20%, соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для установления филогенетических взаимоотношений был проведен сравнительный анализ мтДНК двух форм серебряного карася *Carassius auratus gibelio*, одного из подвидов японского серебряного карася *C. auratus cuvieri*, золотого карася *Carassius carassius* и карпа (сазана) *Cyprinus carpio*. Если допустить, что гиногенетическая форма серебряного карася возникла в результате гибридизации, тогда анализ мтДНК позволяет совершенно определенно идентифицировать по крайней мере один из видов, участвовавших в этом процессе.

ПЦР-ПДРФ-анализ двух участков митохондриальной ДНК ND3/ND4 и 12S/16S рРНК сазана, золотого карася, японского подвида серебряного карася *C. auratus cuvieri* и серебряного карася *C. auratus gibelio* показал, что серебряные караси образуют отдельный кластер, в котором присутствуют две группы гаплотипов серебряного карася *C. auratus gibelio* (рис. 2). Одну филогруппу формируют гаплотипы А, В, С, D, Е, F, G, обнаруженные как у диплоидных, так и полиплоидных серебряных карасей, встречающихся во всех исследованных регионах: в Приморье, Китае, Средней Азии, европейской части РФ. Вторая филогруппа представлена одним гаплотипом (Н), который обнаруживается только на территории Дальнего Востока, и встречается только у бисексуальных (диплоидных) особей (табл. 1, рис. 2). Вторая филогруппа мтДНК *C. auratus gibelio* кластеризуется с гаплотипом I *C. auratus cuvieri* (рис. 2).

В кластере, представляющем первую филогруппу *C. auratus gibelio*, выделяются две подгруппы гаплотипов, в одну из которых включен гаплотип А, наиболее часто встречающийся на всем ареале, а также гаплотип G (обнаружен только в Рыбинском водохранилище) и гаплотип В. Последний обнаружен в оз. Ханка, бассейне р. Туманган на юге Приморья и в бассейне р. Сырдарья (табл. 1). С этими гаплотипами группируется гаплотип F, найденный у одного триплоидного самца оз. Ханка. Отдельную группу в пределах

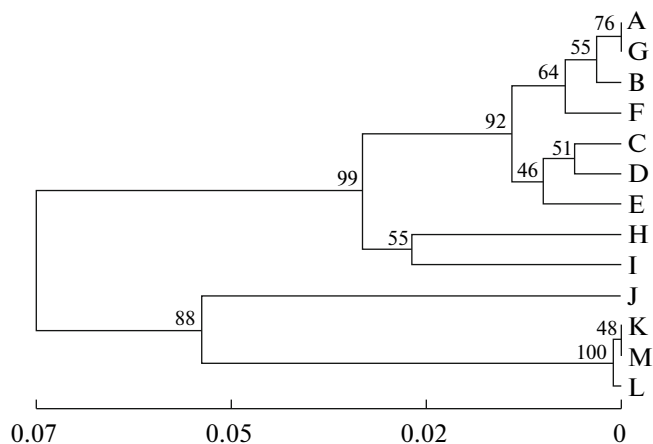


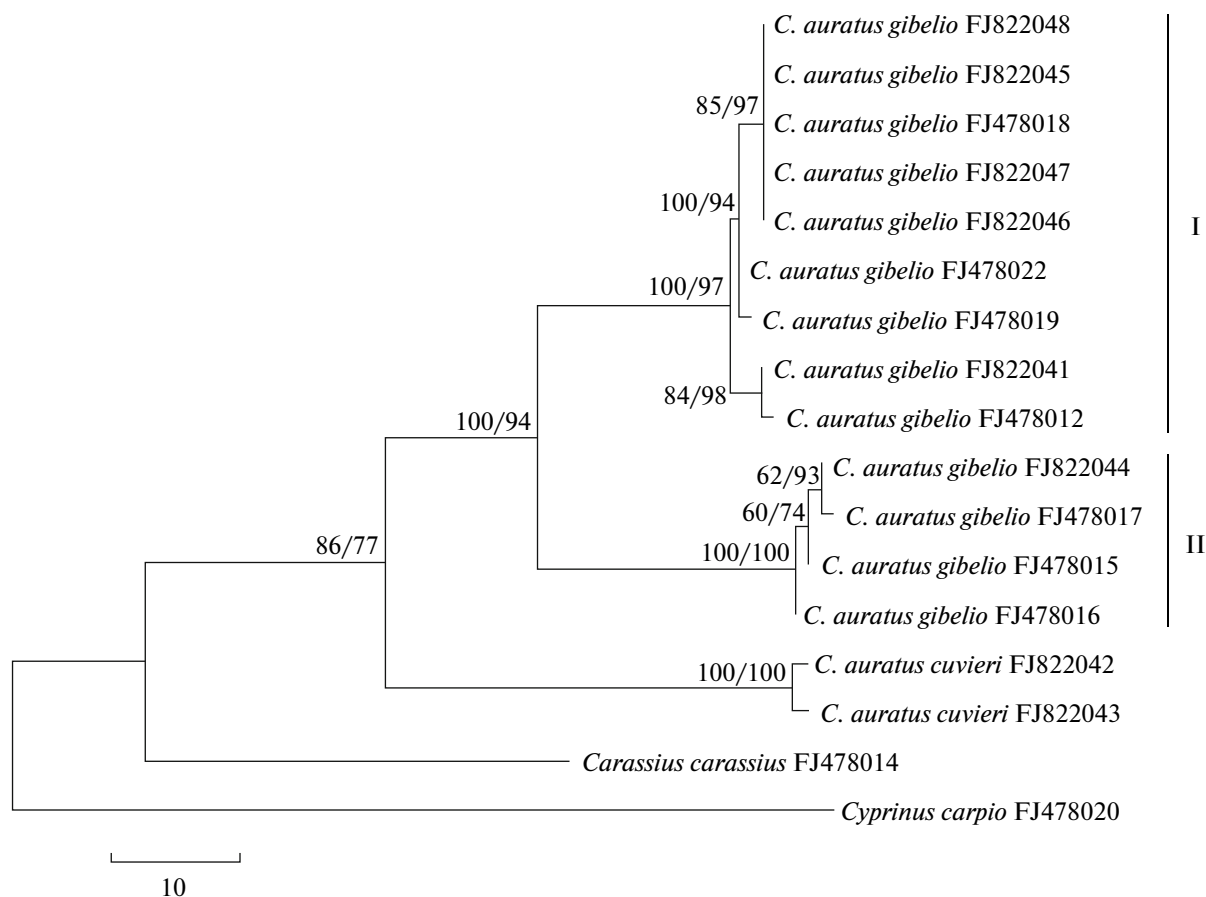
Рис. 2. UPGMA – фенограмма, иллюстрирующая генетические дистанции между гаплотипами *C. auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri*, *C. carassius* и *Cyprinus carpio*. В узлах ветвей даны значения ВР-поддержки (1000 реплик) устойчивости ветвей для дерева сходной топологии (50%-ный консенсус).

первой филогруппы формируют три уникальных гаплотипа (С, D, Е), обнаруженных в бассейне р. Сырдарья (рис. 2).

Между наиболее распространенными гаплотипами А и Н, представляющими две различные филогруппы, генетическое расстояние составляет 2.8% нуклеотидных замен (н.з.). Бутстреп-поддержка разделения этих филогрупп составляет 99%. Между гаплотипом Н и гаплотипом I японского серебряного карася *C. auratus cuvieri* насчитывается 2.6% н.з., тогда как расстояние между гаплотипом I и гаплотипами первой группы *C. auratus gibelio* варьирует от 3.3% до 4% н.з. МтДНК золотого карася отличается от гаплотипов обеих филогрупп *C. auratus gibelio* примерно 7% н.з. (от 6.5% между гаплотипами А и J и Н и J, до 7.4% между гаплотипами J и G). Расстояние между гаплотипом золотого карася и гаплотипом I *C. auratus cuvieri* насчитывает 5.9% н.з (табл. 3).

Различия между гаплотипами сазана *Cyprinus carpio* (K, L, M) и серебряного карася *Carassius auratus gibelio* составляют 6.8–8% н.з. С гаплотипом I *C. auratus cuvieri* различия гаплотипов сазана насчитывают от 6.6% до 6.8% нуклеотидных замен. Расстояние между гаплотипами сазана и золотого карася варьирует от 5 до 5.2% н.з. (табл. 3).

Для анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* у карасей был секвенирован участок размером 765 пар нуклеотидов. В качестве внешней группы использован сазан (каarp) *Cyprinus carpio* из р. Амур. Согласно расположению ветвей МР-дерева золотой карась и два исследованных подвида серебряного карася образуют два отдельных кластера (рис. 3). С высокой бутстреп-поддержкой (80%) ветвь серебряных карасей дивергирует на ветвь японско-



**Рис. 3.** МР-дерево (50%-ный консенсус), иллюстрирующее филогенетические отношения представителей рода *Carassius* и *Cyprinus carpio* на основании последовательности гена *cytb*. В узлах ветвей показаны значения бутстреп-поддержки устойчивости ветвей МР-дерева ( $n = 1000$ ) и значения поддержки устойчивости ветвей (модель нуклеотидного замещения НКУ+9 для В1-дерева сходной топологии (%)). Справа отчеркнуты I и II филогруппы.

го серебряного карася *Carassius auratus cuvieri* и ветвь *C. auratus gibelio*, которая, в свою очередь, демонстрирует разделение на два кластера, в один из которых входят диплоидные особи *C. auratus gibelio*, представляющие вторую группу гаплотипов, а другой кластер объединяет диплоидных и триплоидных особей *C. auratus gibelio*, относящихся к первой филогруппе. Оценка бутстреп-поддержки ветвления двух перечисленных выше кластеров превышает 90% (рис. 3). Необходимо отметить, что положение золотого карася в полученных двух филогенетических схемах несколько отличается: при использовании ПЦР-ПДРФ-анализа этот вид кластеризуется с сазаном (рис. 2), а при сравнении фрагмента гена цитохрома *b* — с различными формами серебряных карасей (рис. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, полученные с использованием двух методов — ПДРФ-анализа двух участков ND3/ND4L/ND4 и 12S/16S рРНК и анализа из-

менчивости нуклеотидной последовательности участка гена цитохрома *b* двух подвидов серебряного карася, золотого карася и сазана, показали, что величины дивергенции между исследованными видами и формами близки и филогенетические схемы также сходны (табл. 3, 5; рис. 2, 3). В обеих полученных дендрограммах варианты мтДНК филогрупп серебряного карася формируют отдельный кластер. Одна из ветвей кластера представляет группу диплоидных и триплоидных серебряных карасей *Carassius auratus gibelio*. В эту группу вошли гаплотипы, обнаруженные в выборках р. Раздольной, оз. Ханки, водоема вблизи г. Дальнегорска, бассейна р. Сырдарьи, Рыбинского водохранилища и водоема из провинции Шаньдунь (Китай). Второй кластер представлен гаплотипом второй филогруппы, обнаруженным у диплоидных серебряных карасей р. Раздольной, оз. Безымянного (о-в Сахалин), р. Камчатки (п-ов Камчатка) (рис. 2, 3). Таким образом, полученные данные подтверждают наличие опреде-

**Таблица 5.** Генетические расстояния между секвенированными участками цитохрома *b* исследованных проб (1–17 – номера проб, приведены в табл. 4)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		92.7	92.7	94.9	99.3	99.3	99.3	99.3	99.9	91.5	95.0	95.2	95.0	99.3	99.5	87.1	99.6
2	7.9		99.7	92.0	92.3	92.3	92.3	92.3	92.5	90.5	92.2	92.3	91.9	92.3	92.4	84.8	92.5
3	7.9	0.3		92.0	92.3	92.3	92.3	92.3	92.5	90.5	92.2	92.3	91.9	92.3	92.4	85.0	92.5
4	5.4	8.6	8.6		95.0	95.0	95.0	95.0	94.8	90.6	99.9	99.7	99.9	95.0	95.2	86.3	95.3
5	0.7	8.3	8.3	5.2		100.0	100.0	100.0	99.2	91.4	95.2	95.3	95.2	100.0	99.6	87.1	99.7
6	0.7	8.3	8.3	5.2	0.0		100.0	100.0	99.2	91.4	95.2	95.3	95.2	100.0	99.6	87.1	99.7
7	0.7	8.3	8.3	5.2	0.0	0.0		100.0	99.2	91.4	95.2	95.3	95.2	100.0	99.6	87.1	99.7
8	0.7	8.3	8.3	5.2	0.0	0.0	0.0		99.2	91.4	95.2	95.3	95.2	100.0	99.6	87.1	99.7
9	0.1	8.0	8.0	5.5	0.8	0.8	0.8	0.8		91.4	94.9	95.0	94.9	99.2	99.3	86.9	99.5
10	9.2	10.4	10.4	10.3	9.4	9.4	9.4	9.4	9.4		90.7	90.7	90.5	91.4	91.4	86.1	91.5
11	5.2	8.5	8.5	0.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	10.1		99.9	99.7	95.2	95.3	86.4	95.4
12	5.1	8.3	8.3	0.3	4.9	4.9	4.9	4.9	5.2	10.1	0.1		99.6	95.3	95.4	86.5	95.6
13	5.2	8.8	8.8	0.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.4	10.5	0.3	0.4		95.2	95.3	86.4	95.4
14	0.7	8.3	8.3	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	9.4	5.1	4.9	5.1		99.6	87.1	99.7
15	0.5	8.2	8.2	5.1	0.4	0.4	0.4	0.4	0.7	9.4	4.9	4.8	4.9	0.4		87.2	99.9
16	14.5	17.4	17.3	15.5	14.5	14.5	14.5	14.5	14.7	15.7	15.4	15.2	15.4	14.5	14.4		87.3
17	0.4	8.0	8.0	4.9	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	9.2	4.8	4.7	4.8	0.3	0.1	14.2	

Примечание. Над диагональю – процент сходства, под диагональю – процент различий.

ленной связи между плоидностью особей и принадлежностью к той или иной филогруппе мтДНК [37]. Такада с соавт. [40] исследовали изменчивость мтДНК в комплексе *Carassius auratus*, который, по-видимому, идентичен *Carassius auratus gibelio*. Проведенный анализ большого числа особей из большого числа водоемов Японских островов, о. Тайвань и материковой Евразии также выявил наличие двух филогрупп (“суперклады” по терминологии авторов) мтДНК. В то же время их результаты не выявляют какой-либо связи между плоидностью особей и принадлежностью мтДНК особей к той или иной “суперкладе” [40].

Сравнительный анализ выявляет, что мтДНК золотого карася отличается от мтДНК *Carassius auratus gibelio* обеих филогрупп примерно 6% нуклеотидных замен. Основные гаплотипы (А и Н), составляющие две филогруппы мтДНК серебряного карася, равноудалены от мтДНК золотого карася. Митохондриальные линии обоих видов карасей примерно равноудалены от мтДНК карпа: 6–8% нуклеотидных замен составляет рассто-

яние между гаплотипами мтДНК серебряного карася и карпа, 7% нуклеотидных замен – между мтДНК золотого карася и карпа (табл. 3). Именно эта равноудаленность создает неопределенность в филогенетическом положении золотого карася: в одном случае он кластеризуется с сазаном (рис. 2), в другом – с серебряным карасем (рис. 3). Поэтому можно полагать, что дивергенция предковой формы всех трех видов происходила в примерно одно и то же время. Если использовать для оценки времени дивергенции “молекулярные часы”, то начальный этап соответствует началу Плиоцена (около 4–6 млн. лет назад). Известно, что этот период характеризовался значительными палеоклиматическими изменениями, определявшими эволюцию видов [41, 42].

Полученные данные подтверждают большее генетическое родство между двумя формами серебряного карася по отношению к золотому карасю и сазану (карпу). Уровень дивергенции между второй филогруппой мтДНК, представляющей бисексуальную форму серебряного карася *C. auratus gibelio*, и мтДНК карася с Японских остро-



вов, *C. auratus cuvieri*, составил 2.6% (табл. 3). Примечательно, что между двумя филогруппами мтДНК *C. auratus gibelio* степень дивергенции оказалась также около 2.5% нуклеотидных замен. Между первой филогруппой *C. auratus gibelio* и *Carassius auratus cuvieri* дивергенция выше: до 4% нуклеотидных замен. 3.7% определено между гаплотипом японского серебряного карася и самым распространенным гаплотипом (А) гиногенетической формы *C. auratus gibelio*. Этот факт позволяет предполагать, что гаплотип, представляющий вторую филогруппу мтДНК и распространенный только на Дальнем Востоке, появился раньше, чем гаплотип А, характерный для гиногенетической формы. Остается открытым вопрос о причинах столь значительного уровня различий по мтДНК между двумя формами *C. auratus gibelio*, сопоставимого с оценкой дивергенции между подвидами *C. auratus cuvieri* и *C. auratus gibelio*.

Полученные нами данные, а также данные других авторов [40] свидетельствуют о наличии внутри группы еще одного этапа дивергентной эволюции. Почти в одно время от предковой формы дивергировал вид Японских островов (*C. auratus cuvieri*) и у *C. auratus gibelio* формировались две филогруппы мтДНК. Эти две филогруппы длительное время существовали независимо, о чем говорит отсутствие переходных гаплотипов, исчезнувших в результате “сортировки” [37]. Однако впоследствии, при вторичном контакте, произошло смешение двух форм мтДНК, и обе формы мы обнаруживаем в одних и тех же популяциях. Возможно, что этот этап дивергенции был обусловлен появлением гиногенетической формы. Рассчитанное время дивергенции, около 1 млн. лет назад, приходится на начало Плейстоцена, для которого характерно изменение палеоклимата в Северном полушарии с периодическими климатическими колебаниями, наступлениями и отступлениями ледников [41, 42]. Против предположения о дивергенции мтДНК в результате появления гиногенетической формы свидетельствует тот факт, что триплоидная гиногенетическая форма обнаруживается у разных подвигов серебряного карася [13, 16], и таким образом предполагается, что различные триплоидные формы могли возникать независимо [40]. Полученные нами данные подтверждают высокую вероятность генетического обмена между формами в настоящее время. И, таким образом, наши данные, наряду с данными по высокому морфологическому сходству [13], не позволяют рассматривать эти формы как отдельные виды.

Полученные нами данные не дают однозначного ответа на вопрос, могли ли другие виды, золотой карась или сазан (кари), участвовать в образова-

нии полиплоидной гиногенетической формы серебряного карася. Причина этого лежит в особенности наследования мтДНК только по материнской линии. Очевидно, что при образовании гиногенетической формы по типу гибридизации со стороны серебряного карася в этом процессе участвовали только самки. Процесс гибридизации с односторонним переносом мтДНК только от одного вида к гибридной форме известен среди рыб [43]. Решить вопрос о втором предковом виде можно только сравнительным исследованием ядерных генов, которые приходят к гибридной форме от обоих родителей.

Авторы выражают благодарность Ю.М. Ковалеву за помощь в сборе материала, а также доктору Кенджи Саито (Dr. Kenji Saitoh, Tohoku National Fisheries Research Institute).

Настоящее исследование выполнено при поддержке гранта ДВО РАН 09-III-A-192 и гранта РФФИ № 10-04-91164 GFEN\_a.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Soltis D.E., Soltis P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution // Trends Ecol. Evol. 1999. V. 14. P. 348–352.
2. Leggatt R.A., Iwama G. Occurrence of polyploidy in fishes // Rev. Fish Biol. Fisher. 2003. V. 13. P. 237–246.
3. Schultz R.J. Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates // Am. Nat. 1969. V. 103. P. 605–619.
4. Ruiguang Z., Zheng S., Wanguo L. Studies on karyotypes and nuclear DNA contents of some cyprinoid fishes, with notes on fish polyploids in China // Indo-Pacific Fish Biology: Proc. of the Second Intern. Conf. on Indo-Pacific Fishes / Eds Uyeno T., Arai R., Taniuchi T., Matsuura K. Tokyo: Ichthyological Society of Japan, 1986. P. 877–885.
5. Dawly R.M. An introduction to unisexual vertebrates // Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates / Eds Dawly R.M., Bogart J.P. // Bulletin N.Y. State Museum, Albany, N.Y., 1989. № 466. P. 1–18.
6. Gui J.F. Evolutionary genetic of unisexual vertebrates // Nature J. 1989. V. 12. P. 116–122.
7. Vrijenhoek R.C., Dawly R.M., Cole C.J., Bogart J.P. A list of known unisexual vertebrates // Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates / Eds Dawly R.M., Bogart J.P. // Bulletin, N.Y. State Museum, Albany, N.Y., 1989. № 466. P. 19–23.
8. Kondrashov A.S. The asexual ploidy cycle and the origin of sex // Nature. 1994. V. 370. P. 213–216.
9. Гребельный С.Д. Клонирование в природе. Санкт-Петербург: ЗИН РАН, 2008. 288 с.
10. Schultz R.J. Role of polyploidy in the evolution of fishes // Polyploidy: Biological Relevance / Ed. Lewis W.H. N.Y.: Plenum Press, 1980. P. 313–340.

11. Берг Л.С. Рыбы пресноводных вод СССР и сопредельных стран. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1949. Т. 3. 930 с.
12. Nakamura M. Cyprinid fishes of Japan. Studies on the life history of Cyprinid fishes of Japan. Tokyo: Res. Inst. Nat. Res. Contrib., 1969. № 1198. 455 p.
13. Васильева Е.Д., Васильев В.П. К проблеме происхождения и таксономического статуса триплоидной формы серебряного карася *Carassius auratus* (Cyprinidae) // Вопр. ихтиологии. 2000. Т. 40. С. 581–592.
14. Головинская К.А., Ромашов Д.Д., Черфас Н.Б. Однополые и двуполые формы серебряного карася (*Carassius auratus gibelio* Bl.) // Вопр. ихтиологии. 1965. Т. 5. № 4. С. 614–629.
15. Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука, 1985. 300 с.
16. Murakami M., Matsuba C., Fujitani H. The maternal origins of the triploid ginbuna *Carassius auratus langsdorfi*: Phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing // Genes Genet. Syst. 2001. V. 76. P. 25–32.
17. Muramoto J. A note on triploidy of the funa (Cyprinidae, Pisces) // Proc. Jap. Acad. 1975. V. 51. P. 583–587.
18. Fišter S. Karyotype analysis of a *Carassius auratus gibelio* Bloch (Pisces, Cyprinidae) male caught in Tamiš River // Acta vet. 1989. V. 39. P. 99–108.
19. Fišter S., Soldatovič B. Karyotype analysis of a gynogenetic population of *Carassius auratus gibelio* Bloch (Cyprinidae) from Pancevacki Rit // Acta vet. 1989. V. 39. P. 259–268.
20. Zhou L., Gui J.F. Karyotype diversity in polyploid gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch // Genetica. 2002. V. 115. P. 223–232.
21. Zhu H.P., Ma D.M., Gui J.F. Triploid origin of the gibel carp as revealed by 5S rDNA localization and chromosome painting // Chromosome Research. 2006. V. 14. P. 767–776.
22. Абраменко М.И., Кравченко О.В., Великоиваненко А.Е. Генетическая структура популяций в диплоидно-триплоидном комплексе серебряного карася *Carassius auratus gibelio* в бассейне нижнего Дона // Вопр. ихтиологии. 1997. Т. 37. № 1. С. 62–71.
23. Murakami M., Fujitani H. Polyploid-specific repetitive DNA sequences from triploid ginbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*) // Genes Genet. Syst. 1997. V. 72. P. 107–113.
24. Yang L., Gui J.F. Positive selection on multiple antique allelic lineages of transferrin in the polyploid *Carassius auratus* // Mol. Biol. Evol. 2004. V. 21. P. 1264–1277.
25. Черфас Н.Б. Гиногенез у рыб. Гл. 7 // В.С. Кирпичников. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука, 1987. С. 309–335.
26. Fan Z., Shen J. Studies on evolution of bisexual reproduction in crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) // Aquaculture. 1990. V. 84. P. 235–244.
27. Fan Z., Liu G. The ploidy and reproductive mechanism of crucian carp, *Carassius auratus gibelio* // J. Fish. Biol. 1990. V. 36. P. 415–419.
28. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
29. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
30. McElroy D., Moran P., Bermingham E., Kornfield I. REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data // J. Heredity. 1992. V. 83. P. 153–158.
31. Rohlf F.J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.60. N.Y.: Exter publ. Ltd., 1990.
32. Posada D., Crandall K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution // Bioinformatics. 1998. V. 14. № 9. P. 817–818.
33. Swofford D.L. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods) Version 4.0 b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.
34. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny // Bioinformatics. 2001. V. 17. P. 754–755.
35. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
36. Toth B., Varkonyi A., Hidas A. et al. Genetic analysis of offspring from intra- and interspecies crosses of *Carassius auratus gibelio* by chromosome and RAPD analysis // J. Fish Biol. 2005. V. 66. P. 784–797.
37. Аналикова О.В., Елисейкина М.Г., Ковалев М.Ю., Брыков Вл.А. Сопоставление уровней плоидности и филогенетических линий митохондриальной ДНК у серебряного карася *Carassius auratus gibelio* из популяций Дальнего Востока и Средней Азии // Генетика. 2008. Т. 44. № 7. С. 1000–1008.
38. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // Experientia. 1980. V. 36. P. 1014–1015.
39. Черфас Н.Б., Ильясова В.А. Индуцированный гиногенез у гибридов серебряного карася и карпа // Генетика. 1980. Т. 16. № 7. С. 1260–1269.
40. Takada M., Tachihara K., Kon T. et al. Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia // BMC Evolutionary Biology. 2010. V. 10. № 7. P. 1–18.
41. Zachos J., Pagani M., Sloan L. et al. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present // Science. 2002. V. 292. P. 686–693.
42. Kobayashi I., Takano O. Records of major and minor transgression and regression events in the Paleo-Sea of Japan during Late Cenozoic // Revista Mexicana de Ciencias Geológicas. 2001. V. 19. P. 226–234.
43. Hubbs C.L., Hubbs L.C. Breeding experiments with the invariably female strictly matroclinous fish *Mollienesia formosa* // Genetics (USA). 1946. V. 31. P. 218.

**Phylogenetic Relationships of Silver Crucian Carp *Carassius auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri*, Crucian Carp *C. carassius*, and Common Carp *Cyprinus carpio* As Inferred from Mitochondrial DNA Variation**

**O. V. Apalikova<sup>a</sup>, A. V. Podlesnykh<sup>a</sup>, A. D. Kukhlevsky<sup>a, b</sup>, S. Guohua<sup>c</sup>, Vl. A. Brykov<sup>a, b</sup>**

<sup>a</sup> *Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia*  
*e-mail: ovapal@yahoo.com, vlbrykov@mail.ru*

<sup>b</sup> *Department of Genetics, Far East State University, Vladivostok, 690600 Russia*

<sup>c</sup> *Marine Fisheries Research Institute of Shandong, 264006 China*

PCR–RFLP analysis of the ND3/ND4L/ND4 and 12S/16S rRNA regions and nucleotide sequence variation of the cytochrome *b* gene were used to study the mtDNA divergence in species of the family Cyprinidae, to examine the phylogenetic relationships of the species, and to identify their taxonomic status. The results indicated that an ancestral form diverged into silver crucian carp and crucian carp after its separation from the common carp lineage. The divergence of continental *Carassius auratus gibelio* and Japanese *C. auratus cuvieri* occurred more recently. Two well distinguishable mtDNA phylogroups, suggesting divergent evolution, were observed in continental *C. auratus gibelio* populations. The divergence was possibly related to the formation of two silver crucian carp groups with different types of reproduction, triploid gynogenetic and diploid gonochoric. At the same time, the results supported the high probability of current genetic exchange between the forms. In view of these findings and high morphological similarity of the two forms, they were not considered to be separate species.