

УДК 575.17:597.553.2

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ СЕРЕБРЯНОГО КАРАСЯ В КОМПЛЕКСЕ *Carassius auratus* НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

© 2012 г. А. В. Подлесных¹, О. В. Апаликова¹, Вл. А. Брыков^{1,2}

¹Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток 690059
e-mail: vlbrykov@mail.ru, podlesnykh9@yandex.ru

²Дальневосточный Федеральный университет, кафедра клеточной биологии и генетики, Владивосток 690600
Поступила в редакцию 03.04.2012 г.

На основе данных по изменчивости нуклеотидных последовательностей цитохрома b (*cyt b*) и контрольного региона (CR) мтДНК исследовали филогенетические отношения подвидов рода *Carassius*. Дендрограммы, построенные на основе BA, ML, NJ и MP методов, выявили пять конгруэнтных топологий кластеров, в значительной степени соответствующих географическому местоположению и таксономическим представлениям *C. auratus*-комплекса. Анализ топологий двух фрагментов мтДНК показал, что островные формы Японских серебряных карасей *C. cuvieri* и *C. auratus langsdorfii* дивергировали позже материковых форм *C. auratus* (4.0–4.5 млн. лет назад по молекулярной калибровке). Среди материковых серебряных карасей *C. a. gibelio* формирует два кластера, соответствующих двум филогруппам со средней нескорректированной генетической дистанцией $p = 0.044$. В кладе *C. a. auratus* наблюдается генеалогическое смешение гаплотипов с первой филогруппой *C. a. gibelio*. Эти подвиды по данным анализа фрагментов мтДНК представляют собой сестринские линии с уровнем межгрупповой дивергенции $p = 0.022$ – 0.036 . Не обнаружено генетических различий между диплоидными (кроме двух филогрупп *C. a. gibelio*) и полиплоидными *C. a. auratus*, как и монофилии полиплоидных форм. Применение новых подходов, основанных на сравнительном исследовании ядерных маркеров, могут прояснить происхождение гиногенетических форм и филогенетических отношений внутри *C. auratus*-комплекса.

Представители рода *Carassius* (Cyprinidae) широко распространены по всей Евразии, включая Японские острова и о. Тайвань на востоке. По существующей на данный момент систематике, в состав рода входят три основных вида: золотой карась *Carassius carassius*, распространенный главным образом в европейской части континента, *C. cuvieri* (или *C. auratus cuvieri*), эндемичный для Японии [1, 2], и серебряный карась *C. auratus*. Среди серебряных карасей (*C. auratus*) выделяют еще четыре подвида: *C. auratus langsdorfii*, *C. auratus burgeri* и *C. auratus grandoculis* (также эндемичные для Японских островов) и *C. auratus gibelio*, широко распространенный по всей Евразии [1, 3]. Континентальный серебряный карась предположительно представлен двумя подвидами, *C. auratus auratus* и *C. auratus gibelio* [4]. В ряде работ для этих таксонов используются синонимы названий в виде *C. auratus* и *C. gibelio*, что создает определенные проблемы в идентификации видов (или подвидов) при исследовании филогении внутри рода *Carassius*.

За исключением *C. cuvieri*, все исследованные популяции которого представлены диплоидной бисексуальной формой [2], во многих азиатских популяциях *C. auratus*-комплекса обнаруживают-

ся генетически отличающиеся, однако морфологически трудноразличимые формы: диплоидная, триплоидная и тетраплоидная [5–8]. Соотношение полов в диплоидных популяциях близко к равному, и размножение у них происходит обычным гонохорическим способом. Триплоидные и тетраплоидные популяции состоят главным образом из гиногенетически размножающихся самок и незначительной доли самцов с триплоидным набором хромосом [9–12]. Считается, что *Carassius auratus* является нативным только для азиатской части ареала [13], однако некоторые авторы полагают, что триплоидную форму можно рассматривать как нативную для Европы [12, 14]. Точная морфологическая идентификация подвидов и форм внутри вида *C. auratus* весьма затруднена из-за высокой пластичности морфологических признаков, меняющихся в зависимости от условий среды обитания, а также, вероятно, из-за возможности скрещивания между подвидами [2, 15].

Таким образом, серебряный карась на всем ареале представляет собой комплекс подвидов *Carassius auratus*, систематические и филогенетические отношения внутри которого не до конца ясны. Это связано как с высокой вероятностью ошибки в отнесении особей к тому или иному ви-

ду или форме, разным набором признаков (в том числе и молекулярных), используемых для сравнения, ограниченными регионами исследования, так и с высокой вероятностью интродукции декоративных форм. Существование у подвидов *C. auratus* бисексуальных и гиногенетических линий дает основания предполагать, что формы триплоидного серебряного карася, возможно, представляют собой сложные клоны полифилетического происхождения [2, 3, 16–18]. В связи с этим проблема разрешения филогенетических отношений внутри *C. auratus*-комплекса является актуальной в настоящее время.

Исследования, основанные на сравнительном анализе митохондриальной ДНК (мтДНК), широко используются для выяснения и уточнения филогенетических отношений организмов, включая диплоидные (бисексуальные) и триплоидные (гиногенетические) популяции. В настоящей работе мы анализируем вопросы филогении и эволюции серебряных карасей в системе *C. auratus*-комплекса на основе исследований изменчивости двух участков митохондриального генома на значительной части географического ареала. В анализ были включены как собственные данные, так и нуклеотидные последовательности из базы данных (NCBI/GenBank).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для филогенетических исследований *C. auratus*-комплекса была отобрана 41 (из них 20 получены нами) нуклеотидная последовательность по цитохрому b (*cyt b*) и 40 (18 собственных) по контрольному региону (CR) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>). В качестве внешней группы использовали последовательности *Cyprinus carpio*. Оригинальные названия рыб и локализация мест взятия приведены в табл. 1. Чтобы избежать разночтения в синонимии названий подвидов континентального *C. auratus* в работе использовали названия *C. a. auratus* и *C. a. gibelio*. Вместе с тем в табл. 1 и рисунках использованы названия, под которыми последовательности зарегистрированы в NCBI/GenBank. Выбор количества последовательностей был ограничен конечной длиной матриц нуклеотидных маркеров мтДНК.

Для выделения тотальной ДНК использованы ткани сердца и плавников, фиксированные в 96%-ном этаноле. ДНК выделяли стандартным методом [19]. Фрагменты последовательности гена *cyt b* и CR амплифицировали в 12.5 мкл реакционной смеси, состоящей из 1.25 мкл 10× ПЦР буфера (750 мМ Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 1.25 мкл 10 мМ смеси dNTP (2.5 мМ каждого), 1.25 мкл 2.5 мкМ каждого праймера, 1.25 мкл 25 мМ MgCl₂, 10 нг ДНК и 1 ед. *Taq* ДНК полимеразы. Для амплификации последовательности гена *cyt b* и CR использовали следующие

пары праймеров: Fish Cyt B-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, Cag F1 5'-TTC GCA CTG TTC CTT GTT CTC TTC-3' и Cag R1 5'-GTC GGG ACC ATG CCT TTG TG-3', соответственно.

Условия ПЦР для гена *cyt b* были следующими: 94°C – 3 мин, последующие 35 циклов 94°C – 30 с, 57°C – 30 с, 72°C – 1 мин 30 с и финальный цикл 68°C – 5 мин. Условия амплификации для ПЦР CR-фрагмента включали: 94°C – 3 мин, последующие 30 циклов 94°C – 30 с, 54°C – 30 с, 72°C – 1 мин 20 с и финальный цикл 72°C – 5 мин. Чистоту и размеры продуктов реакции определяли в 1%-ном агарозном геле.

Очищенные продукты амплификации секвенировали, используя набор реактивов Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Последовательности нуклеотидов определяли на ABI Prism 3130 секвенаторе. Прямые и обратные секвенальные продукты для каждого образца выравнивали с помощью программы SeqScape v2.5 (Applied Biosystems).

Полученные фрагменты последовательностей генов *cyt b* и контрольного региона (CR) депонировали в генетическом банке данных (NCBI/GenBank) (табл. 1). Выравнивание последовательностей выполняли по алгоритму ClustalW с использованием программного обеспечения MEGA5 [20]. Конечная длина матрицы по *cyt b* составила 862 пн, из них 209 переменных и 150 парсимонийно-информативных сайтов. Матрица последовательностей гена контрольного региона (CR) составила 410 пн (из них 88 переменных и 60 парсимонийных сайтов).

Для филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей использовали пакеты программ PAUP 4.0 b 10 [21] и MEGA 5 [20]. Филогенетические отношения оценивали с использованием методов ближайшего соседства (NJ), максимальной парсимонии (MP) и максимального правдоподобия (ML). Устойчивость кластеризации филогенетических деревьев оценивали в 1000 итераций бутстреп-анализа [22]. Байесовский анализ (BA) осуществляли в программе Mr. Bayes v. 3.1.2 [23].

Оптимальные модели нуклеотидного замещения рассчитывали в программах PAUP 4.0 b 10 [21], Modeltest 3.7 [24] и jModelTest [25]. При реконструкции деревьев из 41 последовательностей *cyt b* в качестве наилучшей для построения NJ деревьев была выбрана на основе (ML) теста по AIC-критерию модель TN93+G. Филогенетический анализ 40 последовательностей (CR) региона для NJ-метода проводили с использованием модели T92+G. Начальные деревья для ML-анализа двух фрагментов нуклеотидных последовательностей строились на основе BIONJ-метода с

Таблица 1. Последовательности мтДНК представителей рода *Carassius* и *Cyprinus carpio*

(a)	Вид/повид**	Страна, место сбора**	Плоидность	<i>n</i>	NCBI/GenBank код
	<i>Carassius auratus</i>	Чешская республика		2	DQ399924, DQ399925
	<i>Carassius auratus</i> “Oranda”	Чешская республика		1	EU663584
	<i>Carassius auratus</i> “Shubunkin”	Чешская республика		1	EU663574
	<i>Carassius auratus auratus</i>	Чешская республика		1	FJ169952
	<i>Carassius auratus</i>	Китай, р. Янцзы		2	EU663597, EU663598
	<i>Carassius auratus auratus</i>	Китай, Хунань, водная система Дунтинху	2 <i>n</i> , 3 <i>n</i> , 4 <i>n</i>	3	GU086395, GU086396, GU086397
	<i>Carassius auratus auratus</i>	Россия, Владивосток	2 <i>n</i> , 2 <i>n</i> , 2 <i>n</i>	3	JF694778*, JF694779*, JF694780*
	<i>Carassius gibelio</i>	Узбекистан, бассейн р. Сырдарья	3 <i>n</i> , 3 <i>n</i>	2	GU170380*, GU170381*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, Дальний Восток, Приморье, р. Лебединка		1	GU170384*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, бассейн р. Волга	3 <i>n</i>	1	GU170378*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, Дальний Восток, Приморье, оз. Ханка	3 <i>n</i> , 4 <i>n</i>	1	FJ478022*, FJ822041*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, Дальний Восток, Приморье, оз. около Дальнегорска		1	FJ478019*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, Дальний Восток, Приморье, р. Раздольная	2 <i>n</i> , 2 <i>n</i>	2	FJ478017*, FJ478018*
	<i>Carassius gibelio</i>	Китай, Яньтай	3 <i>n</i> , 3 <i>n</i>	2	FJ822046*, FJ822048*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, о. Сахалин, оз. Безымянное	2 <i>n</i>	1	GU170377*
	<i>Carassius gibelio</i>	Чешская республика, бассейн Одера		1	DQ399928
	<i>Carassius gibelio</i>	Чешская республика, Глубока, бассейн Эльбы		2	DQ399933, DQ399934
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, п-ов Камчатка, р. Камчатка	2 <i>n</i> , 2 <i>n</i>	2	FJ822044*, GU170383*
	<i>Carassius cuvieri</i>	Япония, Томе Мияги		1	FJ822043*
	<i>Carassius cuvieri</i>	Япония, Канагава		1	AB045144
	<i>Carassius auratus langsdorfii</i>	Япония, Хоккайдо, оз. Абашири		3	DQ399920, DQ399921, DQ399922
	<i>Carassius auratus langsdorfii</i>	Чешская республика, Хрудимки, бассейн Эльбы		2	DQ399930, DQ399932
	<i>Carassius auratus langsdorfii</i>	Чешская республика		1	FJ169953
	<i>Carassius carassius</i>	Германия, бассейн Швейнтин		1	DQ399919
	<i>Carassius carassius</i>	Россия, бассейн р. Волга		1	FJ478014*
	<i>Cyprinus carpio</i>	Россия, бассейн р. Амур		1	FJ478020*
(б)					
	<i>Carassius auratus auratus</i> “Wakin”	Япония, Сидзуока		1	AB379950
	<i>Carassius auratus auratus</i> “Tetsugyo”	Япония, Сидзуока		1	AB379935
	<i>Carassius auratus auratus</i> “Ranchu”	Япония, Сидзуока		1	AB379953
	<i>Carassius auratus auratus</i> “Ranchu”	Китай, Гуанчжоу		1	AB379956

Таблица 1. Окончание

(б)	Вид/повид**	Страна, место сбора**	Плоидность	<i>n</i>	NCBI/GenBank код
	<i>Carassius auratus auratus</i>	Китай, Хунань, водная система Дунтинху	2 <i>n</i> , 3 <i>n</i> , 4 <i>n</i>	3	GU086395, GU086396, GU086397
	<i>Carassius auratus auratus</i>	Россия, Владивосток	2 <i>n</i> , 2 <i>n</i>	2	JF694782*, JF694783*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, Дальний Восток, Приморье, оз. Ханка	3 <i>n</i> , 4 <i>n</i>	2	GQ985472*, GQ985483*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, Дальний Восток, Приморье, р. Раздольная	2 <i>n</i> , 3 <i>n</i>	2	GQ985473*, GQ985480*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, Дальний Восток, Приморье, р. Лебединка		1	GQ985479*
	<i>Carassius gibelio</i>	Узбекистан, бассейн р. Сырдарья	3 <i>n</i> , 3 <i>n</i> , 3 <i>n</i>	3	GQ985476*, GQ985477*, GQ985478*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, бассейн р. Волга	3 <i>n</i>	1	GQ985475*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, о. Сахалин, оз. Безымянное	2 <i>n</i>	1	GQ985474*
	<i>Carassius gibelio</i>	Россия, п-ов Камчатка, р. Камчатка	2 <i>n</i>	1	GQ985481*
	<i>Carassius gibelio</i>	Китай, Яньтай	3 <i>n</i>	1	GQ985484*
	<i>Carassius auratus gibelio</i>	Чешская республика		2	FJ167412, FJ167414
	<i>Carassius auratus gibelio</i>	Китай		3	EF633623, EF633629, EF633631
	<i>Carassius gibelio</i>	Швеция		2	JN117598, JN117606
	<i>Carassius auratus gibelio</i>	Китай, Кайпинга		1	AB377292
	<i>Carassius auratus langsdorfii</i>	КНР		3	DQ985007, DQ985008, DQ985009
	<i>Carassius auratus langsdorfii</i>	КНР		2	DQ985010, DQ985011
	<i>Carassius cuvieri</i>	Япония, Томе Мияги		2	GQ985486*, GQ985485*
	<i>Carassius cuvieri</i>	Япония, Канагава		1	AB045144
	<i>Carassius carassius</i>	Чешская республика, бассейн р. Морава		1	DQ007649
	<i>Carassius carassius</i>	Чешская республика		1	FJ167426
	<i>Cyprinus carpio</i>	Тайвань		1	NC001606

* Данные авторов.

** Оригинальные названия и места сбора взяты из NCBI/GenBank; (a) – цитохром b (*cyt b*), (б) – контрольный регион (CR).

дистанциями MCL (Maximum Composite Likelihood) с использованием модели НКУ85 и дискретным гамма (G) распределением [26].

MP-деревья были построены с применением CNI (Close-Neighbor-Interchange)-алгоритма с уровнем поиска 1, в котором начальные деревья были получены случайным добавлением последовательностей из 10 реплик [20]. Для реконструкции байесовских деревьев (BA) использовали модель НКУ85+G при следующих заданных

параметрах MCMC: 2 100 000 генераций, дискретизация каждые 200 генераций.

При анализе топологий мтДНК филогенетических деревьев использовали оценки межгрупповой дивергенции (*p*-дистанции) и внутригруппового нуклеотидного разнообразия (π) [20, 27]. Филогенетические деревья строили и редактировали с помощью FigTree1.3.1. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) и MEGA 5 [20].

Таблица 2. Оценки межгрупповой дивергенции последовательностей двух нуклеотидных маркеров мтДНК на основе *p*-расстояний представителей рода *Carassius* и *Cyprinus carpio*

Вид/подвид 1	Вид/подвид 2	<i>cyt b</i> <i>p</i> -расстояние	Std. Err	CR <i>p</i> -расстояние	Std. Err
<i>C. a. auratus</i> I	<i>C. a. gibelio</i> II	0.0226	0.0039	0.0363	0.0083
<i>C. a. auratus</i> I	<i>C. a. gibelio</i> III	0.0520	0.0068	0.0366	0.0089
<i>C. a. gibelio</i> II	<i>C. a. gibelio</i> III	0.0444	0.0063	0.0398	0.0088
<i>C. a. auratus</i> I	<i>C. a. langsdorfii</i> IV	0.0695	0.0078	0.0470	0.0091
<i>C. a. gibelio</i> II	<i>C. a. langsdorfii</i> IV	0.0690	0.0078	0.0486	0.0092
<i>C. a. gibelio</i> III	<i>C. a. langsdorfii</i> IV	0.0653	0.0076	0.0313	0.0075
<i>C. a. auratus</i> I	<i>C. cuvieri</i> V	0.0722	0.0086	0.0854	0.0129
<i>C. a. gibelio</i> II	<i>C. cuvieri</i> V	0.0751	0.0090	0.0744	0.0124
<i>C. a. gibelio</i> III	<i>C. cuvieri</i> V	0.0769	0.0091	0.0630	0.0112
<i>C. a. langsdorfii</i> IV	<i>C. cuvieri</i> V	0.0738	0.0080	0.0632	0.0104
<i>C. a. auratus</i> I	<i>C. carassius</i> VI	0.0809	0.0090	0.0713	0.0121
<i>C. a. gibelio</i> II	<i>C. carassius</i> VI	0.0828	0.0091	0.0647	0.0119
<i>C. a. gibelio</i> III	<i>C. carassius</i> VI	0.0912	0.0099	0.0547	0.0106
<i>C. a. langsdorfii</i> IV	<i>C. carassius</i> VI	0.0854	0.0091	0.0682	0.0110
<i>C. cuvieri</i> V	<i>C. carassius</i> VI	0.0906	0.0090	0.0655	0.0114
<i>C. a. auratus</i> I	<i>Cyprinus carpio</i>	0.1275	0.0108	0.1138	0.0140
<i>C. a. gibelio</i> II	<i>Cyprinus carpio</i>	0.1240	0.0105	0.1219	0.0144
<i>C. a. gibelio</i> III	<i>Cyprinus carpio</i>	0.1315	0.0111	0.1219	0.0145
<i>C. a. langsdorfii</i> IV	<i>Cyprinus carpio</i>	0.1293	0.0110	0.1219	0.0145
<i>C. cuvieri</i> V	<i>Cyprinus carpio</i>	0.1475	0.0120	0.1078	0.0143
<i>C. carassius</i> VI	<i>Cyprinus carpio</i>	0.1341	0.0116	0.1119	0.0148

РЕЗУЛЬТАТЫ

Филогенетический анализ на основании фрагмента *cyt b*

При сравнении фрагмента *cyt b* длиной 862 пн *C. auratus*-комплекса у 38 особей был выявлен 21 гаплотип по 136 полиморфным сайтам. Филогенетический анализ с использованием методов BA, ML, NJ и MP выявил кластеры сходной топологии (рис. 1). В комплексе *C. auratus* выявляется пять клад (I–V). В значительной степени клады на филогенетическом дереве соответствуют таксономическим представлениям, основанным на географической локализации выборок и распространении *C. auratus*-комплекса. Отдельную кладу формирует золотой карась *Carassius carassius*. Японские серебряные караси формируют две далеко отстоящие от материковых клады и соответствуют двум подвидам: *C. a. langsdorfii* (клада IV) и *C. cuvieri* (клада V). Величина генетических различий между этими подвидами и материковыми представителями *C. auratus*-комплекса достигает 7–8% нуклеотидных замен (табл. 2). Все материковые особи формируют три клады. Кладу III формируют диплоидные особи из рек Приморья, Сахалина и Камчатки (табл. 1). Уровень дивер-

генции между этой линией серебряных карасей (III) и двумя другими кладами (I, II) составляет 4–5%, причем эта кладка отличается относительно низкой внутригрупповой изменчивостью ($\pi = 0.17 \pm 0.09\%$). Линии *C. a. auratus* (I) и *C. a. gibelio* (II) представляют собой сестринские клады с уровнем межгрупповой дивергенции $p = 2.3 \pm 0.4\%$ (табл. 2).

Величина внутригрупповой изменчивости в линии *C. a. auratus* (клада I) относительно выше, чем в кладке *C. a. gibelio* (клада II) и составляет: $\pi = 0.53 \pm 0.14\%$ и $\pi = 0.29 \pm 0.11\%$, соответственно. В линии *C. a. gibelio* (II) объединяются диплоидные и полиплоидные особи из разных локальностей Евразии, что свидетельствует о близких взаимоотношениях между гаплотипами в пределах разных географических популяций (внутригрупповое разнообразие $\pi = 0.33 \pm 0.16\%$).

В кладку *C. a. auratus* (I) наряду с дикими формами вошли различные декоративные морфы карасей, что показывает их тесное генетическое родство. При этом нативные особи китайского серебряного карася (GU086395–GU086397) из естественных популяций бассейна Dongting (Китай, Хунань), представляющие собой диплоидные и полиплоидные формы, занимают внешнее поло-

жение по отношению к остальным *C. a. auratus* (рис. 1). Результаты анализа комбинированных топологий фрагмента *cyt b* показали, что три особи *C. gibelio* (GU170380, GU170381 и GU170384) из естественных водоемов Средней Азии и Приморья (Россия) с высокой степенью поддержки объединяются с *C. a. auratus* (I) (рис. 1).

Филогения на основе анализа контрольного региона (CR)

При анализе CR фрагмента длиной 410 пп *C. auratus*-комплекса было выявлено 19 гаплотипов по 59 полиморфным сайтам. Комбинированные мтДНК топологии, полученные с использованием всех методов расчетов, не выявляют принципиальных отличий от топологии на основе анализа *cyt b* между вероятными таксономическими единицами в группе *C. auratus*-комплекса (рис. 1, 2). С высоким уровнем поддержки также дифференцируются *C. a. langsdorfii* (клада IV) и *C. cuvieri* (клада V). По сравнению с фрагментом *cyt b* не меняется величина дивергенции с материковыми формами в случае *C. cuvieri* (7%), но ее показатель несколько меньше в случае *C. a. langsdorfii* (3–5%) (табл. 2).

Особи, формирующие кладу (III) в случае анализа фрагмента *cyt b*, также образуют отдельную кладу *C. a. gibelio* (III) и по фрагменту CR с высоким уровнем поддержки и одинаковой величиной различий от первой и второй клад 3.6–4% (рис. 1, 2, табл. 2). Однако мтДНК топологии показывают несколько иную генеалогию *C. a. auratus* (I) и *C. a. gibelio* (II) (рис. 2).

Часть особей *C. gibelio*, кроме GU170380, GU170381 и GU170384, в случае генеалогии по *cyt b* находившихся в кладе (II) (табл. 1, рис. 1), образовали монофилетическую линию с *C. a. auratus* (I) (рис. 2) со средним внутригрупповым разнообразием $\pi = 0.56 \pm 0.18\%$. В данном случае, по-видимому, использование первой трети фрагмента контрольного региона в отличие от более длинных кодирующих последовательностей менее эффективно в разрешении порядка ветвления внутри *C. auratus*-комплекса. Низкая разрешающая способность мтДНК топологий, основанных на анализе гипервариабельного фрагмента контрольного региона, может быть связана с ограничивающим влиянием отбора на изменчивость последовательностей контрольного региона. Такое явление “генетического потолка” изменчивости CR последовательностей кроме представителей

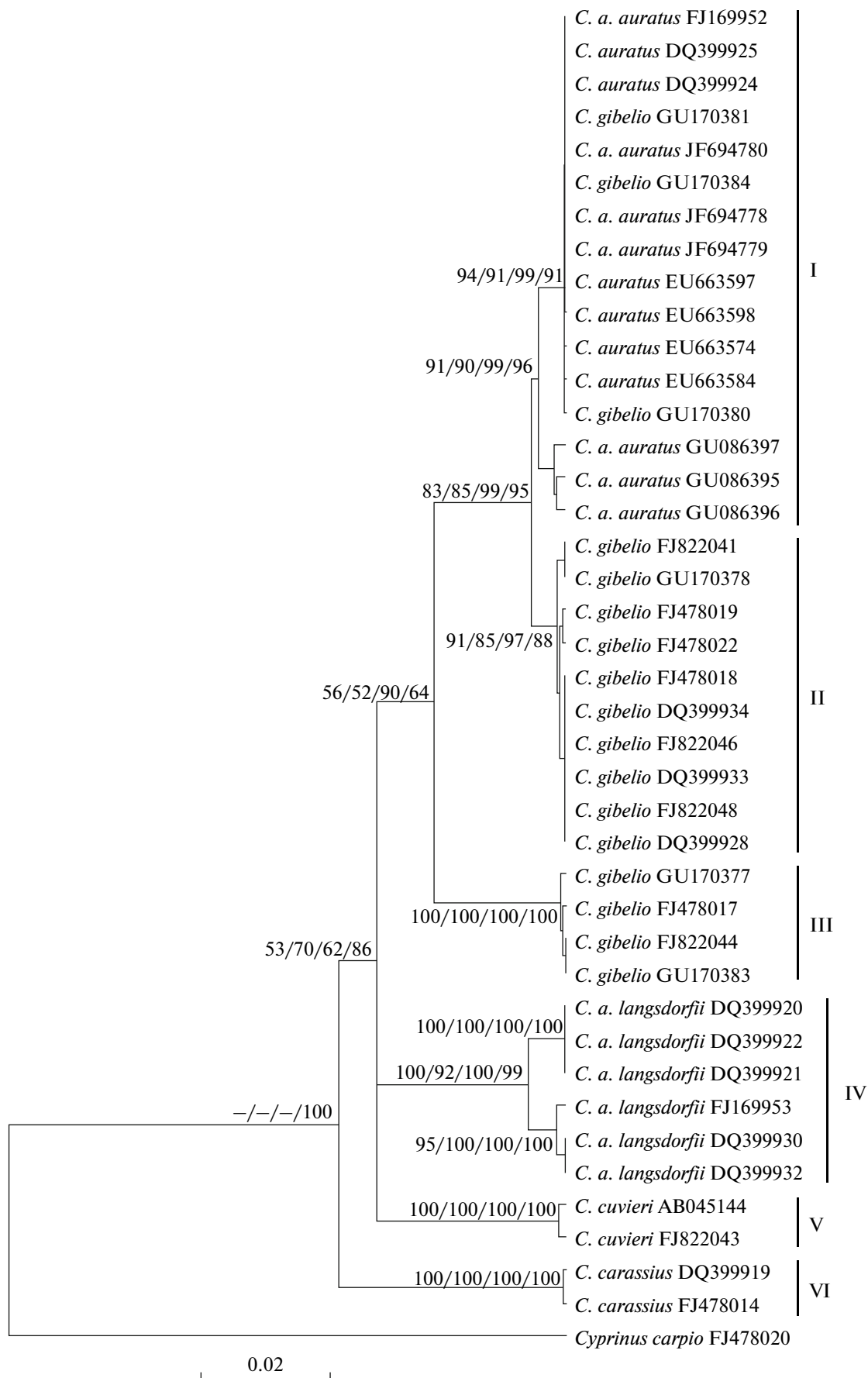
C. auratus-комплекса выявлено и у представителей других семейств рыб [28, 29].

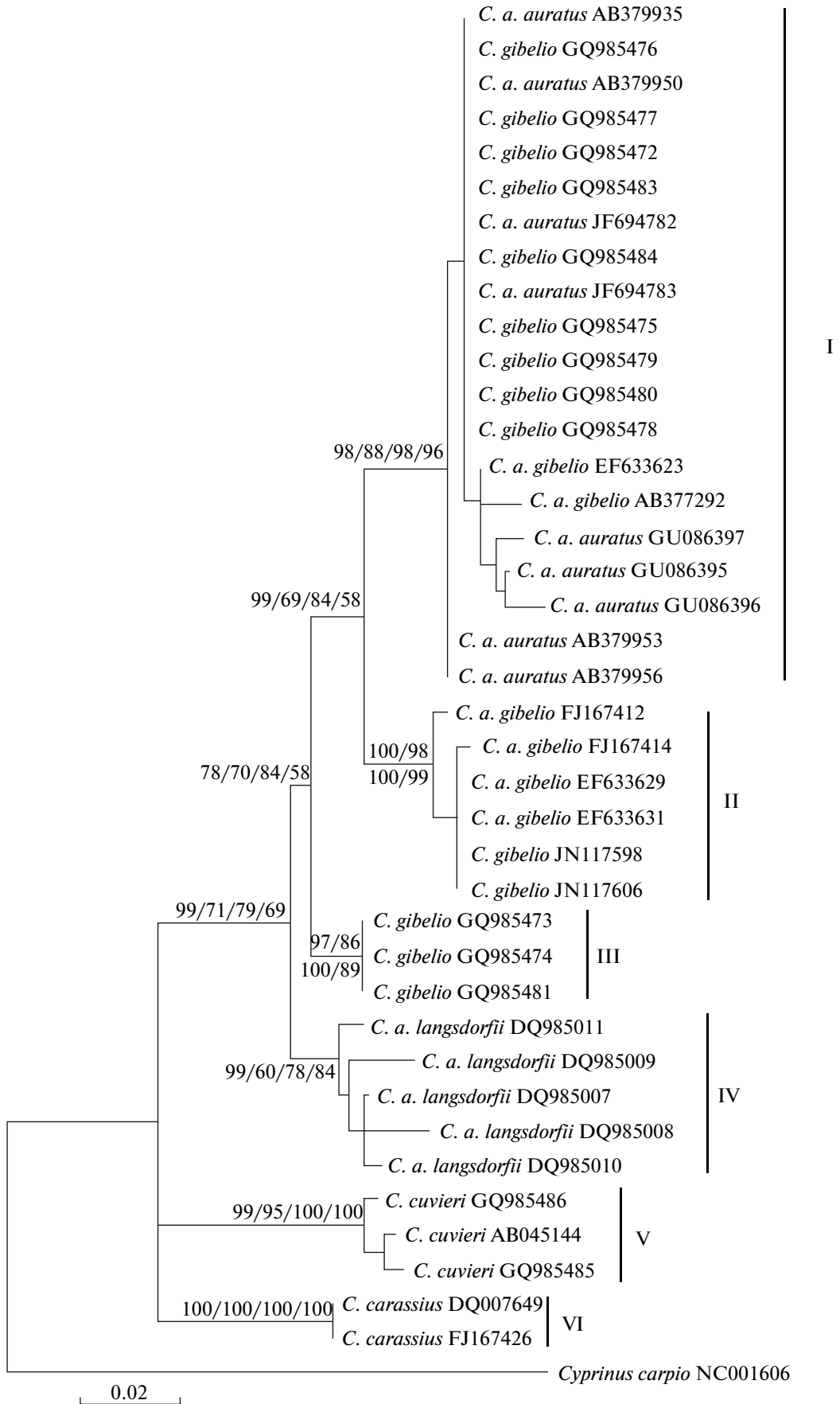
Клады I и II также представляют собой сестринские линии с уровнем дивергенции $p = 3.6 \pm 0.8\%$. В линии *C. gibelio* (II) объединяются особи из разных географических локальностей, что подтверждает близкое родство гаплотипов в пределах разных географических локальностей (внутригрупповое разнообразие $\pi = 0.33 \pm 0.16\%$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные подтвердили высокий таксономический статус двух подвидов островных карасей: *C. cuvieri*, представленный только диплоидной формой, и *C. a. langsdorfii*. Последний подвид образует диплоидную и полиплоидную формы, обитающие симпатрично [2]. Наши данные согласуются с данными Такады с соавт. [29], в соответствии с которыми суперклада А, по-видимому, соответствует мтДНК островных форм серебряных карасей, в то время как суперклада В соответствует материковым формам *C. auratus*-комплекса [29]. Уровень дивергенции мтДНК двух этих форм по сравнению с материковыми формами *C. auratus*-комплекса значительно превышает известные рамки внутривидовых различий для пресноводных рыб [30, 31]. Средняя величина дивергенции мтДНК между островными и материковыми формами по фрагментам *cyt b* и CR составляет $p = 0.075 \pm 0.011\%$ и $p = 0.059 \pm 0.008\%$ (соответственно), а между двумя островными формами $p = 0.073 \pm 0.008\%$ и $p = 0.063 \pm 0.010\%$ (соответственно) (табл. 2). Следовательно, и время независимой эволюции также близко. Если использовать скорость нуклеотидных замен мтДНК по *cyt b* калибровке в 1.6% за 1 млн. лет [32, 33], то начальный этап дивергенции приходится на период 4.0–4.5 млн. лет назад, что примерно соответствует позднему Плиоцену [34]. На этот же период указывают и Такада с соавторами как на время дивергенции суперклад А и В мтДНК серебряных карасей [29]. По мнению этих авторов, указанный период совпадает с дивергенцией островной и континентальной пресноводной фауны и заселением Японских островов предковыми линиями *C. auratus*. Диверсифицирующими факторами, по-видимому, явились регрессии уровня океана, и как следствие, образование мостов суши между островами Японского архипелага и материком [35].

Рис. 1. Дендрограмма (50% консенсус) филогенетических отношений представителей рода *Carassius* и *Cyprinus carpio* в качестве внешней группы на основе последовательностей *cyt b*. Цифры в узлах ветвей сходной топологии – значения байесовских (BA) апостериорных вероятностей и оценки бутстреп-поддержки (%) для ML, NJ и MP деревьев соответственно. Статистические поддержки в узлах ветвления показаны только для основных клад. Римскими цифрами с правой стороны дерева обозначены номера клад.





В соответствии с географическим положением принято деление материковых форм *C. auratus*-комплекса на два подвида: *C. a. auratus*, распространенный в Китае, и *C. a. gibelio*, обитающий в Европе и Китае [3]. Известно, что диагностика различий по морфологическим признакам диких *C. a. auratus* и *C. a. gibelio* весьма затруднительна [14]. Кроме того, во многих популяциях серебряных карасей Евразии встречаются как диплоидная бисексуальная форма, так и гиногенетическая триплоидная [36]. Очевидно биологическое значение различий способов размножения между формами, при этом отсутствуют четкие критерии различий между ними по морфологическим признакам. Есть предположение, что триплоидные серебряные караси могут иметь полиморфное происхождение и представлять собой сложные клоны полифилетического происхождения в результате множественных гибридизаций [2, 3, 17, 18]. В связи с этим нельзя исключать и таксономических ошибок при идентификации этих подвидов.

Комбинированные топологии на основе изменчивости двух участков митохондриального генома выявили сходную, устойчивую генеалогию клады *C. a. gibelio* (III) среди *C. auratus*-комплекса. Эту линию серебряных карасей образуют диплоидные особи из р. Раздольной (Приморье), оз. Безымянного (Сахалин) и р. Камчатки (Камчатка). Ранее эта клада карасей была описана на основе RFLP и мтДНК анализов как вторая филогруппа *C. a. gibelio* [7, 16] и до недавнего времени не определялась больше нигде на ареале вида. Если в Приморском крае и на Сахалине эта филогруппа *C. a. gibelio* существует в нативных популяциях, то в р. Камчатку она была интродуцирована в 1929 г. [37]. В р. Раздольной и оз. Безымянном симпатрически существуют как диплоидная (вторая филогруппа), так и состоящая из диплоидных и триплоидных особей (первая филогруппа) линии *C. a. gibelio* [16]. Наши данные по сравнительному анализу нуклеотидных последовательностей мтДНК выявили соответствие первой филогруппы *C. a. gibelio* кладам I и II, а второй филогруппы – кладе III.

В кладах I и II объединяются серебряные караси с различной плоидностью из разных географической локальностей (рис. 1, 2, табл. 1). Как видно из анализа фрагментов мтДНК, дикие формы *C. a. auratus* и различные морфологические варианты декоративной “золотой рыбки” обнаруживаются в кладе *C. a. auratus* (I). При этом предпо-

ложительно предковая форма (GU086395–GU086397) из естественных популяций бассейна Dongting (Китай, Хунань), представленная диплоидными и полиплоидными особями, занимает базальное положение по отношению к остальным *C. a. auratus* (рис. 1, 2). Последнее является подтверждением того, что центром происхождения и последующей селекции “золотой рыбки” является центральный Китай [2, 15, 38].

Результаты анализа комбинированных топологий фрагментов мтДНК показали, что некоторые особи *C. gibelio* первой филогруппы с высокой степенью поддержки объединяются с *C. a. auratus* в кладе I. Ранее филогенетические исследования китайских серебряных карасей на основе ПДРФ анализа мтДНК показали, что особи, определенные как *C. a. gibelio*, также попадают в одну кладу с *C. a. auratus* [3]. Данные, сходные с нашими результатами филогенетического анализа *C. a. auratus* и *C. a. gibelio* на основе последовательностей *cyt b*, были получены Рылковой с соавт. [15].

По нашим данным, в кладе I помимо генеалогического смешения гаплотипов диплоидных и полиплоидных *C. a. auratus* наблюдаются общие с *C. a. gibelio* гаплотипы, что свидетельствует об их тесном генетическом родстве. Таким образом, наши данные наряду с данными других авторов не подтверждают генетических различий между диплоидными и полиплоидными серебряными карасями и монофилии полиплоидных форм. В связи с этим таксономический статус этих двух материковых подвидов серебряного карася требует дальнейшего изучения.

Как было отмечено выше, центрально-восточная часть Азии и прилегающие Японские острова, по-видимому, были регионом происхождения *C. auratus*-комплекса. Дивергенция диплоидного *C. cuvieri*, эндемика Японских островов, предшествует дивергенции между остальными подвидами *C. auratus*-комплекса. Следующий по времени дивергенции подвид, *C. a. langsdorfii*, филогенетически ближе к кладе III, образованной второй филогруппой *C. a. gibelio* (рис. 1, 2). Внутригрупповое разнообразие по *cyt b* *C. a. langsdorfii* значительно выше ($\pi = 1.6 \pm 0.32\%$), чем у *C. a. gibelio* обеих филогрупп ($\pi = 0.29 \pm 0.1\%$, $\pi = 0.17 \pm 0.09\%$), и эта изменчивость, вероятно, сохранилась от предковой формы [2]. Сравнительно низкая генетическая изменчивость второй филогруппы серебряного карася (клада III) может быть связана с величиной эффективного размера популяций, который может изменяться в течение длительной

←
Рис. 2. Дендрограмма (50% консенсус) филогенетических отношений представителей рода *Carassius* и *Cyprinus carpio* в качестве внешней группы на основе последовательностей контрольного региона (CR). Цифры в узлах ветвей сходной топологии – значения байесовских (BA) апостериорных вероятностей и оценки бутстреп-поддержки (%) для ML, NJ и MP деревьев соответственно. Статистические поддержки в узлах ветвления показаны только для основных клад. Римскими цифрами с правой стороны дерева обозначены номера клад.

эволюции под действием целого ряда факторов, например локального вымирания отдельных популяций, колебания численности и соотношения полов [39].

Филогенетические деревья, полученные на основе изменчивости двух участков митохондриального генома, выявили сходные генеалогии II и III клад *C. a. gibelio*.

Как было отмечено выше, вторая филогруппа *C. a. gibelio* (клада III) встречается в ограниченном числе локальностей Дальнего Востока России. В известных нам естественных популяциях о. Сахалин вторая филогруппа доминирует по численности над первой. Вместе с тем в р. Раздольной обе филогруппы *C. a. gibelio* существуют симпатрично, но образуют разные монофилетические линии со средней межгрупповой дивергенцией $p = 4.4 \pm 0.7\%$ и $p = 4.0 \pm 0.9\%$ (по фрагментам *cyt b* и *CR* соответственно) (табл. 2).

Вторая филогруппа *C. a. gibelio* (клада III) состоит только из диплоидных особей, тогда как в первой филогруппе *C. a. gibelio* (клада II) и *C. a. auratus* (клада I) вместе кластеризуются диплоидные и полиплоидные особи (рис. 1 и 2, табл. 1). Аналогичная ситуация обнаруживается в популяциях *C. a. langsdorfii* и *C. auratus*, где мтДНК полиплоидных особей кластеризуются с симпатричными диплоидными формами своего подвида, не образуют монофилетических линий и имеют разное независимое происхождение [2, 8, 29]. В нашем случае, очевидно, что филогенетическая линия клады III является более древней и, вероятно, предковой по отношению к другим материковымкладам серебряных карасей (рис. 1, 2). Величина средней межгрупповой дивергенции двух филогрупп *C. a. gibelio* составляет 4.4–5.2% нуклеотидных замен (табл. 2), при этом начальный этап дивергенции приходится на период 2.5–3.2 млн. лет назад. Это период вероятного потепления, связанного с поднятием уровня океана и соответственно с разрывом пресноводных фаун [35].

Совместное существование в популяции р. Раздольной обеих филогрупп *C. a. gibelio* дает основания предполагать их генетическую изоляцию. При этом уровень дивергенции между филогруппами *C. a. gibelio* (табл. 2) достигает внутривидовых различий для пресноводных рыб [30, 31]. Наличие хиатуса между филогруппами мтДНК указывает на генетическую независимость, вместе с тем отсутствие данных по морфологическим различиям между филогруппами не дает оснований считать их разными таксономическими единицами.

В родственных отношениях материковых форм серебряных карасей обнаруживается определенная аналогия и, возможно, параллелизм с островными подвидами. В обоих случаях базальными являются диплоидные формы: *C. cuvieri* — для островных карасей и вторая филогруппа *C. a. gibelio*

(клада III), — для материковых. Производными от них являются популяции, включающие как диплоидные формы, так и полиплоидные: *C. a. langsdorfii* — в случае островных форм серебряных карасей и клады I, II — в случае материковых форм *C. auratus*. Это согласуется с представлениями о том, что в большинстве событий гиногенетические или партеногенетические виды имеют бисексуальные предковые формы [40]. Наблюдаемые различия по времени дивергенции (дивергенция материковых форм по нашим расчетам произошла несколько позже) могут быть обусловлены как более высокой скоростью накопления различий в мтДНК островных форм, так и реальными различиями периодов дивергенции. В обоих случаях отсутствие четкой морфологической дифференциации между формами с различной пloidностью дает основания полагать, что между ними происходит генетический обмен. Большинство исследователей приходит к заключению, что событие совершается при спонтанном переходе от диплоидного состояния (гонохория) к триплоидному (гиногенез), и наоборот. Предложено несколько моделей такого перехода и получены некоторые экспериментальные доказательства возможности трансформации форм [41–43].

Настоящее исследование выполнено при поддержке гранта ДВО РАН 09_III_A_192 и гранта РФФИ № 10_04_91164 GFEN_a.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Murakami M., Matsuba C., Fujitani H. The maternal origins of the triploid ginbuna *Carassius auratus langsdorfii*: Phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing // Genes Genet. Syst. 2001. V. 76. P. 25–32.
3. Luo J., Zhang Y.P., Zhu C.L., et al. Genetic diversity in Crucian carp (*Carassius auratus*) // Biochem. Genet. 1999. V. 37. P. 267–279.
4. Raicu P., Taisescu E., Bănărescu P. *Carassius carassius* and *C. auratus*, a pair of diploid and tetraploid representative species (Pisces, Cyprinidae) // Cytologia. 1981. V. 46. P. 233–240.
5. Fan Z., Liu G. The ploidy and reproductive mechanism of crucian carp, *Carassius auratus gibelio* // J. Fish. Biol. 1990. V. 36. P. 415–419.
6. Shimizu Y., Oshiro T., Sakaizumi M. Electrophoretic studies of diploid, triploid, and tetraploid forms of the Japanese silver Crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii* // Jap. J. Ichthyol. 1993. V. 40. P. 65–75.
7. Аналикова О.В., Елисейкина М.Г., Ковалев М.Ю., Брыков Вл.А. Сопоставление уровней пloidности 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.
8. Xiao J., Zou T., Chen Y. et al. Coexistence of diploid, triploid and tetraploid crucian carp (*Carassius auratus*) in natural waters // BMC Genetics. 2011. V. 12. P. 15.
 9. Gui J.F. Evolutionary genetics of unisexual vertebrates // Nat. J. (Shanghai). 1989. V. 12. P. 116–122.
 10. Zhou L., Wang Y., Gui J.F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays // J. Mol. Evol. 2000. V. 51. P. 498–506.
 11. Абраменко М.И., Кравченко О.В., Великоуваненко 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. 62–67.
 12. Абраменко М.И., Надтока Е.В., Махоткин М.А. и др. Распространение и цитогенетические особенности триплоидных самцов серебряного карася из Азовского бассейна // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 5. С. 375–386.
 13. Balon E.K. About the oldest domesticates among fishes // J. Fish Biol. 2004. V. 65 (Supplement A). P. 1–27.
 14. Kottelat M., Freyhof J. Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat. Cornol., 2007. P. 142–147.
 15. Rylkova K., Kalous L., Slechtova S., Bohlen J. Many branches, one root: first evidence for a monophyly of the morphologically highly diverse goldfish // Aquaculture. 2010. V. 302. P. 36–41.
 16. Анапикова О.В., Подлесных А.В., Кухлевский А.Д. и др. Филогенетические отношения серебряных карасей *Carassius auratus gibelio* и *C. auratus cuvieri*, золотого карася *C. carassius* и карпа *Cyprinus carpio* на основе изменчивости митохондриальной ДНК // Генетика. 2011. Т. 47. № 3. С. 368–378.
 17. Васильева Е.Д. О морфологической дивергенции гиногенетической и бисексуальной форм серебряного карася *Carassius auratus* (Cyprinidae, Pisces) // Зоол. журн. 1990. Т. 69. № 11. С. 97–110.
 18. 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.
 19. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
 20. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Mol. Biol. and Evol. 2011. V. 28. № 10. P. 2731–2739.
 21. Swofford D.L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) Version 4.0 b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Assoc., 2002.
 22. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
 23. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny // Bioinformatics. 2001. V. 17. P. 754–755.
 24. Posada D., Crandall K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution // Bioinformatics. 1998. V. 14. № 9. P. 817–818.
 25. Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging // Mol. Biol. and Evol. 2008. V. 25. P. 1253–1256.
 26. Guindon S., Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood // Syst. Biol. 2003. V. 52(5) P. 696–704.
 27. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. N.Y. Oxford Univ. Press, 2000.
 28. Takeshima H., Iguchi K., Nishida M. Unexpected ceiling of genetic differentiation in the control region of the mitochondrial DNA between different subspecies of the ayu *Plecoglossus altivelis* // Zool. Sci. 2005. V. 22. P. 401–410.
 29. 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.
 30. Ward R.D., Zemplak T.S., Innes B.H. et al. DNA barcoding Australia's fish species // Philosoph. Transact. Royal Soc. Series. 2005. V. 360. P. 1847–1857.
 31. Hubert N., Hanner R., Holm E. et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes // Public Library of Science. 2008. V. 5. 1–8 p.
 32. Ives K., Taylor E. Evolutionary and biogeographical patterns within the smelt genus *Hypomesus* in the North Pacific Ocean // J. Biogeogr. 2008. V. 35. № 1. P. 48–64.
 33. Брыков Вл.А., Олейник А.Г., Полякова Н.Е. и др. Неравномерность дивергентной эволюции у рыб Северной Пацифики // Генетика. 2010. Т. 46. № 7. С. 967–973.
 34. Квасов Д.Д., Старобогатов Я.И. Климат и фауна кайнозоя // Труды Зоол. ин-та АН СССР. Л., 1985. 116 с.
 35. Kobayasi H., Kawashima Y., Takeuchi N. Comparative chromosome studies in the genus *Carassius*, especially with a finding of polyploidy in the ginbuna // Jap. J. Ichthyol. 1970. V. 17. P. 153–160.
 36. Кирпичников В.С. Генетические основы селекции рыб. Л.: Наука, 1979. 392 с.
 37. Кузнецов И.И. Опыты акклиматизации карасей на Камчатке и красной на Амуре // Рыбн. хоз-во Дальнего Востока. 1931. № 1, 2. С. 49–53.
 38. Komiya T., Kobayashi H., Tateno Y. et al. An evolutionary origin and selection process of goldfish // Gene. 2009. V. 430. № 1–2. P. 5–11.
 39. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М.: Мир, 1985. 398 с.
 40. Гребельный С.Д. Клонирование в природе. СПб.: Геликон, ЗИН РАН, 2008. 288 с.

41. 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.
42. Liu S.J., Sun Y.D., Liu K.K., Liu Y. Evidence of different ploidy eggs produced by diploid F2 hybrids of *Carassius auratus* (♀) × *Cyprinus carpio* (♂) // Acta Genetica Sinica. 2006. V. 3 (4). P. 304–311.
43. Liu S.J., Qin B.Q., Jun X. et al. The formation of the polyploid hybrids from different subfamily fish crossings and its evolutionary significance // Genetics. 2007. V. 176. P. 1023–1034.

Phylogenetic Relationships of Silver Crucian Carp in *Carassius auratus* Complex Based on mtDNA Analysis

A. V. Podlesnykh^a, O. V. Apalikova^a, and V. A. Brykov^{a,b}

^a Zhirmunskii Institute of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690059 Russia
e-mail: vlbrykov@mail.ru; podlesnykh9@yandex.ru

^b Department of Cell Biology and Genetics, Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690600 Russia

The phylogenetic relationships of *Carassius* genus subspecies were investigated based on the data of the variability of nucleotide sequences of the mtDNA cytochrome *b* (*cyt b*) and control region (CR). Dendrograms constructed based on the BA, ML, NJ, and MP methods revealed five clusters of the congruent topologies that substantially corresponded to geographical localities and taxonomic conception of the *C. auratus* complex. An analysis of two mtDNA fragment topologies demonstrated that the island forms of Japanese crucian carps *C. cuvieri* and *C. auratus langsdorfii* diverged later compared to the divergence of continental *C. auratus* forms (4.0–4.5 mln years ago, by molecular calibration). Among the continental silver crucian carps, *C. a. gibelio* forms two clusters corresponding to two phylogroups with a mean uncorrected genetic distance $p = 0.044$. The genealogical combination of haplotypes with the first *C. a. gibelio* phylogroup was observed in *C. auratus* clade. According to the data of mtDNA analysis, these subspecies represent sister lineages with a level of intergroup divergence of $p = 0.022–0.036$. No genetic differences were observed between diploid (except for the two *C. a. gibelio* phylogroups) and polyploid *C. a. auratus*, as well as monophyly in polyploid forms. New approaches based on a comparative study of the nuclear markers might help to unravel the origin of gynogenetic forms and phylogenetic relationships within the *C. auratus* complex.