

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД ИМ. И.Д. ПАПАНИНА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ФОНД НЕКОММЕРЧЕСКИХ ПРОГРАММ ДМИТРИЯ ЗИМИНА «ДИНАСТИЯ»
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биология внутренних вод

Материалы XV Школы-конференции

молодых учёных

(Борок, 19–24 октября 2013 г.)



УДК 57

ББК 28

Б 63

Биология внутренних вод: Материалы XV Школы-конференции молодых учёных (Борок, 19–24 октября 2013 г.).

Компьютерная вёрстка: С.М. Жданова, В.К. Чугунов, В.В. Крылов.
Фотография на обложке: Д.Д. Павлов.

ISBN 978-5-91806-011-7

Кострома: ООО «Костромской печатный дом», 2013. 438 с.

Проведение конференции и публикация сборника материалов осуществлено при финансовой поддержке Российской академии наук, Фонда некоммерческих программ Дмитрия Зимина «Династия» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 13-04-06856-мол_г).

В сборнике представлено содержание лекций и докладов участников XV Школы-конференции молодых учёных «Биология внутренних вод» (Борок, 19–24 октября 2013 г.). Отражён широкий круг вопросов по биоразнообразию флоры и фауны, проблемам его сохранения, биологии видов, составу и структуре сообществ, оценке, мониторингу и прогнозированию состояния водных и прибрежно-водных экосистем, физиолого-биохимическим механизмам адаптации.

Представленные материалы будут полезны для экологов, гидробиологов, ботаников и зоологов, специалистов в области охраны природы и рационального использования природных ресурсов, для преподавателей и студентов биологических и экологических специальностей вузов, учителей и школьников.

© 2013 г. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук

ISBN 978-5-91806-011-7

© 2013 г. Коллектив авторов, текст

Bioindication influence of climatic anomalies on estuarine zooplankton of small tributary of flatland reservoir using mathematical methods

S.E. Bolotov

The changes of hydrobiological regime in mouth area of small tributary of flatland reservoir in condition of weather and climate anomalies have been analyzed. It have been shown, that under influence of high warming up of water at anomalously fervent years the faunal and biocenotic differences of hydroecological zones in mouth area are disappear. Additionally, this causes changes in seasonal dynamics of development of the zooplankton communities and activates ecotone buffer system, which is determines weakened response of zooplankton of frontal zone of tributary mouth area to the anomalously high water temperatures.

Ряпушка (Coregonidae, Salmoniformes) Рыбинского водохранилища: происхождение и генетическое разнообразие популяции.

Е.А. Боровикова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок.*

E-mail: elenalex1@yandex.ru

В работе исследован полиморфизм ND-1 фрагмента митохондриальной ДНК ряпушки (*Coregonus albula*) Рыбинского водохранилища. Полученные данные подтверждают близость рыбинской популяции с популяцией Белого озера. В то же время значительная дивергенция одного из гаплотипов позволяет предполагать вклад в формирование современной популяции Рыбинского водохранилища сиговых-интродуцентов. Значительный уровень полиморфизма мтДНК исследованной популяции, связанный с высокой скоростью мутационного процесса, может быть обусловлен как влиянием условий среды, так и гибридизацией.

Введение

В составе ихтиофауны Рыбинского водохранилища ряпушка (*Coregonus albula*) отмечается с 1943 года (Васильев, 1952). Принято считать, что рыбинская ряпушка является выселенцем из Белого озера. Данная точка зрения подтверждалась результатами сравнения ряда морфологических признаков ряпушек из этих водоемов (Васильев, 1952). В то же время известно, что в середине прошлого века в водохранилище проводились масштабные интродукции представителей рода *Coregonus*, в том числе и ряпушки из разных водоемов Европейского Севера России (обзор: Кудерский, 2001). Считается, что ни одна из предпринятых интродукций не была успешна (Экологические проблемы..., 2001), однако детальные исследования по оценке вклада сиговых-интродуцентов в формирование современной популяции ряпушки водохранилища проведены не были. Среди методов, позволяющих прояснить особенности формирования той или иной популяции, анализ полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК) — одна из наиболее удобных методик (Avisе, 2000). Поэтому целью настоящей работы стало исследовать полиморфизм мтДНК популяции ряпушки Рыбинского водохранилища и на основе полученных результатов проанализировать возможные сценарии ее формирования.

Материалы и методы.

Выборки ряпушки были взяты из нескольких точек Рыбинского водохранилища в 2009–2010 годах (рис. 1). Для анализа полиморфизма мтДНК использовали замороженные пробы тканей (печени и/или белых мышц). Тотальную клеточную ДНК выделяли с использованием набора реагентов *DIAtom™DNA Prep100* (изготовитель ООО «ИзоГен», Москва). С полученных образцов клеточной ДНК с помощью ПЦР синтезировали фрагмент мтДНК длиной примерно 2050 пар нуклеотидов (п.н.), включающий ген, кодирующий субъединицу I NADH-дегидрогеназного комплекса (ND-1 фрагмент). Синтез фрагмента (амплификацию) проводили с применением праймеров, разработанных (Cronin et al., 1993):

LGL381: 5'-ACCCCGCCTGTTTACCAAAAACAT-3' – прямой;

LGL563: 5'-GGTTCATTAGTGAGGGAAGG-3' – обратный.

Амплификационная смесь состояла из 25 мкл буфера для амплификации («Fermentas», Литва), 100-300 нг тотальной клеточной ДНК, по 10-15 пмоль каждого из двух праймеров, по 200 нмоль каж-

дого из четырех дезоксирибонуклеотидов и 0.5-1 ед. Таq-полимеразы («Бионем», Москва; «Fermentas», Литва). Программа амплификации ND-1 фрагмента включала этап первоначальной денатурации ДНК: +95°C — 5 мин; 32 цикла синтеза фрагмента: +95°C — 1 мин, +53°C — 50 сек, 72°C — 1 мин 30 сек; заключительный этап достройки концов: +72°C — 5 мин.

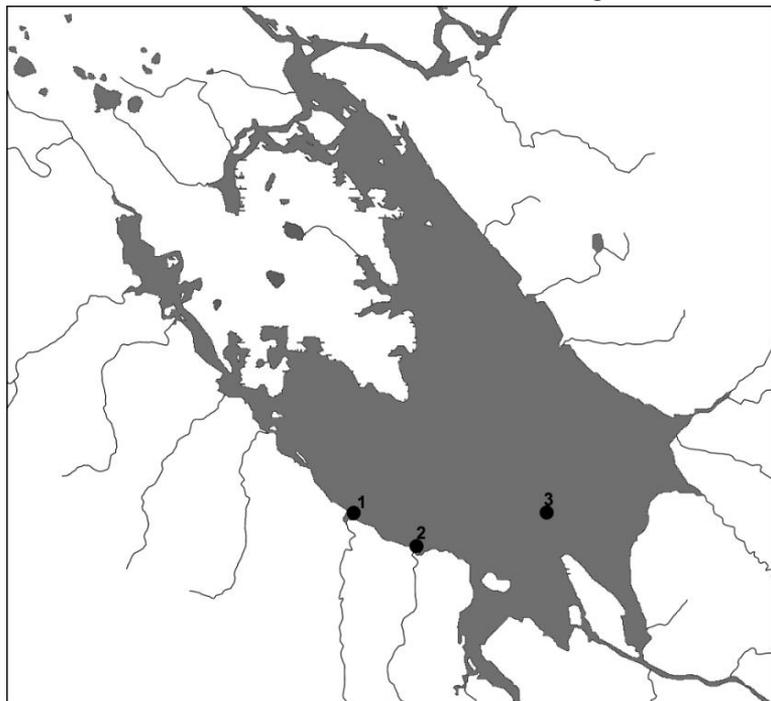


Рис. 1. Места отлова ряпушки в Рыбинском водохранилище: 1 — около пос. Брейтово (2010 г.); 2 — около пос. Горелово (2010 г.); 3 — Всехсвятское (2009 г.).

Для ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестриктных фрагментов) ND-1 фрагмента в работе использован набор из 16 эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз), которые позволяют выявлять полиморфизм мтДНК в популяциях сиговых рыб (Politov et al., 2000). Анализ длин рестриктных фрагментов после расщепления ПЦР-продукта проводили в 2%-ном агарозном геле для всех рестриктаз за исключением *Bst* I. В последнем случае длины фрагментов анализировали в 1.3%-ном геле. С целью выявления полиморфизма, проявляющегося на уровне низкомолекулярных фрагментов, продукты расщепления исследуемого участка мтДНК ферментами *Dde* I и *Hae* III анализировали также в 11%-ном полиакриламидном геле. Для электрофореза использовали трис-ЭДТА-боратную

буферную систему (Маниатис и др., 1984). После электрофореза агарозные и полиакриламидные гели окрашивали раствором бромистого этидия и проводили визуализацию в ультрафиолетовом свете. На основании полученных данных составляли комплексные гаплотипы для каждого образца. В составе комплексных гаплотипов соблюдался следующий порядок рестриктаз: *Ase* I, *Ava* II, *Bsp*1286 I, *Bst* N I, *Bst* U I, *Dde* I, *Dpn* II, *Hae* III, *Hha* I, *Hinc* II, *Hinf* I, *Hph* I, *Msp* I, *Nci* I, *Rsa* I, *Tag* I.

Для характеристики полиморфизма на уровне мтДНК использовали показатели нуклеотидного (π) и гаплотипического (H) разнообразия, которые рассчитывали в пакете программ Arlequin 3.01. (Excoffier et al., 2006). Доля различных нуклеотидов между комплексными гаплотипами (p) рассчитана согласно (Ней, Кумар, 2004). Гетерогенность частот гаплотипов в выборках из разных точек Рыбинского водохранилища оценивали в программе CHIRXC (Zaykin, Pudovkin, 1993).

Результаты

Всего для ряпушки Рыбинского водохранилища описано 11 комплексных гаплотипов (табл. 1). Полиморфными оказались сайты узнавания 14 ферментов рестрикции; сайты узнавания двух ферментов — *Hinf* I и *Hph* I были мономорфны. Доминирует в популяции рыбинской ряпушки комплексный гаплотип VL: частота его превышает 60% (табл. 1). Гаплотип E, обычно преобладающий в популяциях ряпушки Европейского Севера России, в Рыбинском водохранилище имеет низкую частоту. Кроме перечисленных выше обнаружено 8 уникальных, характерных только для данной популяции, комплексных гаплотипов (RY1-RY8), частоты которых варьируют от 0.014 до 0.134 (табл. 1).

Большинство гаплотипов, обнаруженных в популяции водохранилища, происходят от гаплотипа VL и дифференцированы друг от друга нуклеотидными заменами в одном-двух сайтах рестрикции. Исключение составляет лишь гаплотип RY1: отличие его от остальных гаплотипов обусловлено заменами в шести – семи сайтах из 157 проанализированных. Величина дивергенции при попарном сравнении всех гаплотипов (индекс p) варьирует от 0.6% до 4.5%. Наибольшие значения индекса, 4.5%, отмечены при сравнении с гаплотипом RY1; среднее значение показателя для популяции рыбинской ряпушки равно 1.8%.

Сравнение выборок ряпушки из разных точек водохранилища по набору и частотам комплексных гаплотипов позволило выявить их гетерогенность ($\chi^2=42.67$, $df=20$, $p=0.014$). Как видно из таблицы 1, гаплотипы RY2-RY4 были обнаружены только в выборке “Всехсвятское”, в то время как RY5-RY8 и ALBB2 оказались характерными лишь для выборки, отловленной у поселка Брейтово.

Таблица 1. Частоты комплексных гаплотипов, показатели гаплотипического (H) и нуклеотидного (π) разнообразия популяции ряпушки Рыбинского водохранилища.

N п/п	Название гаплотипа	Выборки ряпушки, отловленные в разных точках Рыбинского водохранилища			
		“Всехсвятское”	“Брейтово”	“Горелово”	всего за 2009–2010 г.г.
1	E	0.042	0.021	0.333	0.107
2	BL	0.666	0.574	0.667	0.607
3	RY1	0.166	0.128	—	0.134
4	RY2	0.042	—	—	0.014
5	RY3	0.042	—	—	0.014
6	RY4	0.042	—	—	0.014
7	RY5	—	0.043	—	0.027
8	RY6	—	0.021	—	0.014
9	RY7	—	0.064	—	0.041
10	RY8	—	0.128	—	0.014
11	ALBB2	—	0.021	—	0.014
Всего		24	47	3	74
H		0.5434±0.1111	0.6438±0.5655	0.6667±0.3143	0.5967±0.0616
π		0.0078	0.8142	0.0014	0.0068

Обсуждение

Высокая частота гаплотипа BL в популяции рыбинской ряпушки подтверждает ее близость с ряпушкой Белого озера — в белозерской популяции этот гаплотип является доминирующим. Более того, общим с белозерской ряпушкой является и гаплотип ALBB2, обнаруженный в выборке “Брейтово”. В то же время для популяции Рыбинского водохранилища характерен более высокий уровень полиморфизма исследованного фрагмента мтДНК. Так, показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия рыбинской популяции равны 0.59 и 0.007 (табл. 1), соответственно, в то время как для белозерской популяции их оценки составили лишь 0.19 и 0.001 (Боровикова, 2009). Кроме того, в популяции Рыбинского водохранилища значительна частота уникального гаплотипа RY1, в своем происхождении наиболее далеко отстоящего от гаплотипа BL по сравнению с другими выявленными гаплотипами.

Полученные данные позволяют предполагать смешанное происхождение популяции рыбинской ряпушки: очевидно, предки носителей гаплотипа RY1 не являются вселенцами из Белого озера, а были интродуцированы в водохранилище из иной донорной популяции, при чем, согласно оценкам разных авторов уровень дивергенции мтДНК более 4% характеризует не только уровень географических изолятов, но и межвидовой уровень (Ovenden et al., 1988; Картавцев, Ли, 2006). В то же время установить источник происхождения данного гаплотипа затруднительно — ни в одной из исследованных на данный момент популяции сиговых рыб Европейского Севера России он выявлен не был (Боровикова, 2009).

Еще одной особенностью популяции ряпушки Рыбинского водохранилища является высокий уровень полиморфизма мтДНК, выражающийся в значительном числе редких гаплотипов, несмотря на ее менее чем столетний возраст. Как правило, при сокращении численности популяции (что имеет место и при расселении) уровень полиморфизма мтДНК снижается (Алтухов, 2003). Так, действительно, для бычка (*Proterorhinus* sp.), недавно вселившегося в водохранилище, на данный момент выявлен лишь один гаплотип мтДНК (Слынько и др., 2013). Значения же показателей гаплотипического и нуклеотидного разнообразия рыбинской популяции являются наибольшими по сравнению с рядом нативных популяций ряпушки Европейского Севера России. Лишь для популяции озера Плещеево,

возраст которой можно оценить в несколько десятков тысяч лет, эти показатели имеют большие значения (Боровикова, 2009).

Низкий уровень дивергенции большинства уникальных гаплотипов друг от друга, а также общее происхождение их от распространенного в водохранилище гаплотипа BL и отсутствие в ранее исследованных популяциях ряпушки позволяет предполагать, что они возникли именно в Рыбинском водохранилище. Данный факт свидетельствует о значительном ускорении мутационного процесса, что могло быть вызвано рядом причин. С одной стороны, значительным скоростям появления мутаций в мтДНК могли способствовать неблагоприятные условия обитания в водохранилище, роль которых в ускорении эволюции популяций обсуждается рядом авторов (Скулачев, 1999; Алтухов, 2003 и многие другие).

С другой стороны, привести к резкому увеличению скорости мутирования могла гибридизация, повышающая нестабильность геномов (Chapman, Burke, 2007). Известно, что представители не только разных видов, но даже родов семейства сиговых, легко скрещиваются друг с другом, давая плодовитое потомство (Svärdson, 1979). В условиях, когда в водохранилище вселялись многочисленные формы и виды гибридизация (в том числе и интрогрессивная) могла происходить достаточно часто.

Гетерогенность выборок ряпушки из разных точек водохранилища может быть связана с причинами случайного характера: поскольку частоты уникальных гаплотипов в популяциях, как правило, низки, носители каждого из них случайно могли быть отловлены лишь в один сезон. Несмотря на подобную гетерогенность, скорее всего популяция водохранилища едина, так как ряд гаплотипов, выявленных в одной точке, связаны в своем происхождении с гаплотипами, обнаруженными в другой.

Таким образом, на основе полученных данных можно сделать следующие выводы: 1. популяция ряпушки Рыбинского водохранилища имеет смешанное происхождение; 2. для популяции рыббинской ряпушки характерен высокий уровень полиморфизма мтДНК, что не типично для недавно сформировавшейся популяции. Значительный уровень полиморфизма мтДНК, связанный с высокой скоростью мутационного процесса, может быть обусловлен как влиянием условий среды, так и гибридизацией.

Благодарности. Автор благодарен за помощь в сборе материала [Кияшко В.И.], Карабанову Д.П. и Лавровой Е.И. Работа выполнена при финансовой поддержке Грантов поддержки молодых ученых – кандидатов наук МК-2049.2013.4, МК-2455.2013.4, грантов РФФИ № 11-04-00697-а и 13-04-90814.

Список литературы

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ "Академкнига", 2003. 431 с.
- Боровикова Е.А. Филогеография ряпушек *Coregonus albula* (L.) и *C. sardinella* Valenciennes Европейского Севера России. Автореф. дисс. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. М., 2009. 24 с.
- Васильев Л.И. О ряпушке Рыбинского водохранилища // Труды Всесоюзного гидробиологического общества. 1952. Т. IV. С. 106–114.
- Картавец Ю.Ф., Ли Ж.-С. Анализ нуклеотидного разнообразия по генам цитохрома b и цитохромоксидазы I на популяционном, видовом и родовом уровнях // Генетика. 2006. Т. 42. № 4. С. 437–461.
- Кудерский Л.А. Акклиматизация рыб в водоемах России: состояние и пути развития // Вопросы рыболовства. 2001. Т. 2. № 1(5). С. 6–85.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Ней М., Кумар С. Молекулярная эволюция и филогенетика. Киев: КВЦ, 2004. 418 с.
- Скулачев В.П. Эволюция, митохондрии и кислород // Соросовский образовательный журнал. 1999. № 9. С. 4–10.
- Слынько Ю.В., Боровикова Е.А., Гуровский А.Н. Филогеография и происхождение пресноводных популяций трубконосых бычков рода *Proterorhinus* (Gobiidae: Pisces) Понто-Каспийского бассейна // Генетика. 2013. (в печати).
- Экологические проблемы Верхней Волги: Коллективная монография. Ярославль: Изд-во ЯГТУ, 2001. С. 84–86.
- Chapman M.A., Burke J.M. Genetic divergence and hybrid speciation // Evolution. 2007. V. 61–7. P. 1773–1780.
- Avise J.C. Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, Massachusetts. London, England. Harvard University Press, 2000. 447 pp.
- Cronin M.A., Spearman W.J., Wilmot R.L., Patton J.C., Bickham J.W. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1993. V. 50. P. 708–715.

- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin: An integrated software package for population genetics data analysis. Version 3.01. Bern: Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne, 2006. URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>
- Ovenden J.R., White R.W.G., Sanger A.C. Evolutionary relationships of *Gadopsis* spp. inferred from restriction enzyme analysis of their mitochondrial DNA // J. Fish Biol. 1998. V. 32. P. 137–148.
- Politov D.V., Gordon N.Yu., Afanasiev K.I., Altukhov Yu.P., Bickham J.W. Identification of palearctic coregonid fish species using mtDNA and allozyme genetic markers // J. Fish Biol. 2000. V. 57. Suppl. A. P. 51–71.
- Svårdson G. Speciation of Scandinavian *Coregonus* // Institute of Freshwater Research. Drottningholm. 1979. Report № 57. 95 p.
- Zaykin D.V., Pudovkin A.I. Two programs to estimate of χ^2 values using pseudo-probability tests // J. Heredity. 1993. V. 84. P. 152.

**Vendace (Coregonidae, Salmoniformes) of the Rybinsk reservoir:
origination and genetic polymorphism of the population.**

Е.А. Borovikova

Polymorphism of the mitochondrial ND-1 fragment of the vendace (*Coregonus albula*) from Rybinsk reservoir was investigated. Revealed data support close relationship of the Rybinsk reservoir population and cisco population from Lake Beloye (Upper Volga basin). At the same time considerable differentiation one of the mtDNA haplotypes allow supposing participation of introduction coregonid fish in formation of the reservoir vendace population. High level of the mtDNA polymorphism revealed for this population may be conditioned by rapid speed of the mutation process connected with environmental conditions' influence and/or hybridization.

**Липидные показатели тканей окуня *Perca fluviatilis* L. и ерша *Gymnocephalus cernuus* L.
из акваторий промышленных центров Онежского озера**

О.Б. Васильева¹, Н.В. Ильмаст¹, М.А. Назарова², Н.Н. Немова¹

¹ Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук,
185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11.

² Вологодский государственный педагогический университет, 160035, г. Вологда, ул. Сергея Орлова, 6
E-mail: vasil@krc.karelia.ru, marinamarina35@yandex.ru.

Проведено исследование липидного состава тканей окуня *Perca fluviatilis* L. и ерша *Gymnocephalus cernuus* L., обитающих в акваториях Онежского озера с разной степенью антропогенного влияния. В результате проведенной работы установлены различия в содержании практически всех изученных показателей в печени рыб. Наибольшая количественная разница в жабрах окуня и ерша была показана для структурных компонентов. Липиды мышц у рыб из Петрозаводской губы и Повенецкого залива не отличались, за исключением некоторых параметров. Обнаружены межвидовые особенности липидного состава тканей рыб.

Введение

Онежское озеро является вторым по величине пресноводным водоемом Европы и служит важной водно-транспортной магистралью, широко используется для водоснабжения населенных пунктов Карелии, а также имеет большое рыбохозяйственное значение. На долю Онежского озера приходится около 40% общего улова рыбы в пресных водах Карелии (Состояние водных ..., 2007). Ихтиофауна водоема довольно разнообразна и представлена 36 видами (15 семейств), в том числе и ценными промысловыми – лососевыми и сиговыми рыбами (Ильмаст и др., 2010). Однако, их ареал пространственно неоднороден: наиболее многообразен видовой состав в центральной части Онежского озера, которая сохраняет черты олиготрофного водоема, а в загрязненных губах прослеживается тенденция к снижению разнообразия и численности гидробионтов. Поэтому, в качестве водных биоресурсов особое значение приобретают не так массово используемые в промышленном рыболовстве виды – окуневые, карповые и другие.

Одним из основных источников загрязнения Онежского озера являются сточные воды промышленных центров, к которым относятся Петрозаводск и Медвежьегорск. Большой объем хозяйст-