

## ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ РЯПУШКИ *Coregonus albula* ОЗЕРА ПЛЕЩЕЕВО

© 2017 г. Е. А. Боровикова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,  
152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок, 109

E-mail: elena.ibiw@gmail.com

Поступила в редакцию 21.10.2015 г.

Проанализированы нуклеотидные последовательности двух участков митохондриальной ДНК – ND1-фрагмента и фрагмента, включающего в себя часть гена цитохромоксидазы *c*. Установлено присутствие в популяции европейской ряпушки *Coregonus albula* оз. Плещеево особей-носителей гаплотипов, значительно дифференцированных от распространенных вариантов последовательностей как рассматриваемого, так и других водоемов европейской части России. Отмечено, что уровень внутривидовой генетической дифференциации превысил межвидовой.

DOI: 10.7868/S0002332917030031

Ряпушка *Coregonus albula* – ценный представитель ихтиофауны оз. Плещеево (Ярославская обл.), расположенного на южной границе ареала этого вида. В настоящее время популяция ряпушки оз. Плещеево обитает в пределах национального парка “Плещеево озеро” и имеет статус охраняемой, занесенной в Красную книгу РФ (2001).

Ряпушка оз. Плещеево характеризуется рядом морфоэкологических и физиологических особенностей (Борисов, 1924), которые неоднократно становились поводом для выделения ее в отдельную форму. Так, Борисов (1924) придавал ей статус *C. albula* L. *natio nova pereslavicus*; в работе Берга (1948) ей уже присвоен статус подвида *C. albula pereslavicus*. Согласно последним сводкам самостоятельные подвиды внутри *C. albula* не выделяются, а ряпушка оз. Плещеево рассматривается как локальная эндемичная популяция (Решетников, 1980; Рыбы..., 2010).

Ранее анализ полиморфизма длины рестриктных фрагментов (ПДРФ-анализ) участка митохондриальной ДНК (мтДНК), включающего в себя ген первой субъединицы NADH дегидрогеназного комплекса (так называемый ND1-фрагмент), выявил специфические черты генетического полиморфизма популяции ряпушки этого водоема (Боровикова, 2009). Оказалось, что в исследованной популяции наряду с широко распространенным у *C. albula* европейских водоемов комплексным гаплотипом E присутствует редкий гаплотип ALBP2, отличающийся от первого заменами в сайтах пяти ферментов рестрикции. Максимальное же число замен между гаплотипами в этой популяции достигало различий в 11 сайтах рестрикции

из 85 проанализированных. Подобный размах внутривидовой генетической дифференциации не характерен для ряпушки из водоемов европейской части России: как правило, уровень дифференциации между гаплотипами не превышает замены в 1–2 сайтах рестрикции.

Поскольку ПДРФ-анализ в силу своих методических особенностей дает заниженные оценки уровня генетического полиморфизма, были проанализированы данные о полных нуклеотидных последовательностях ND1-фрагмента рыб-носителей гаплотипов E и ALBP2. Кроме того, для получения дополнительной информации о степени дифференциации этих двух групп особей, был изучен полиморфизм последовательности еще одного участка мтДНК – фрагмента гена первой субъединицы цитохромоксидазы *c* (*COI*), стандартного маркера при штрихкодировании видов.

Цель работы – уточнить степень дифференциации двух внутривидовых групп ряпушки оз. Плещеево, носителей разных гаплотипов мтДНК – E и ALBP2.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Был использован материал, собранный с мая по октябрь 2013–2014 гг. Для последующего генетического анализа мышечная ткань фиксировалась 96%-ным этанолом (1 : 5). ДНК выделяли с использованием наборов реагентов *DIAtom™DNAPrep100* (Лаборатория Изоген, Москва) или ДНК-Экстран-2 (Синтол, Москва).

По результатам предшествующего ПДРФ-анализа ND1-фрагмента для дальнейшей работы бы-

Таблица 1. Исследованный материал

Филогенетическая линия	Водоем	ND1-фрагмент		COI	
		номер NCBI	гаплотип	номер NCBI	гаплотип
ALBP2	оз. Плещеево	—	—	KT254048	C2
		KT254050	N1	KX457958	
		KT254054	N2	KT254053	
E	оз. Горелое, Соловецкие о-ва оз. Старушечье, Карелия Водлозеро, Карелия Рыбинское вдхр.	KX457962	N3	KT254049	C3
		KT254052	N4	KT254051	
		KT254056	N5	KT254055	
		—	—	KT254047	C4
		KT254046	N8	KX457957	
		—	—	KT254057	C1
		KX457961	N9	KX457956	
		KX457960	N10	KX457959	C7
		—	—	—	

Примечание. “—” — для данных особей определена только последовательность COI.

ли отобраны особи-носители гаплотипов E и ALBP2. Нуклеотидную последовательность ND1-фрагмента определяли для трех особей с гаплотипом E и двух особей с гаплотипом ALBP2. Последовательность COI была определена для четырех особей с гаплотипом E и трех ряпушек-носителей гаплотипа ALBP2. Кроме того, для сравнения были проанализированы особи с гаплотипом E из других водоемов европейской территории России (табл. 1).

Для определения нуклеотидной последовательности ND1-фрагмента использовали два внешних праймера LGL381 и LGL563 (Stopin *et al.*, 1993; Politov *et al.*, 2000) и шесть внутренних (Bochkarev *et al.*, 2011). Амплификацию проводили согласно рекомендациям Бочкарева с соавт. (Bochkarev *et al.*, 2011). Последовательность нуклеотидов участка COI мтДНК синтезировали с праймеров Fish-F1 и Fish-R1 (Ward *et al.*, 2005); полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с учетом данных, опубликованных ранее (Ivanova *et al.*, 2007). Определение нуклеотидных последовательностей двух фрагментов мтДНК было выполнено на автоматических анализаторах ABI 3730 (ЦКП “Геном”, ИМБ РАН) и ABI 3500 (ИБВВ РАН) в соответствии с инструкцией производителя. Информация о последовательностях депонирована в базу данных NCBI под номерами KT254046–KT254057, KX457956–KX457962.

Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Для оценки степени дифференциации гаплотипов и их групп рассчитывали *p*-дистанцию с использованием двухпараметрической модели Кимуры (Kimura, 1980). При расчете стандартной ошибки показателя применялась процедура бутстреп (500 повторов). Для построения

сети вариантов нуклеотидной последовательности (Minimum Spanning Network (MSN)) использовали программу NETWORK 4.6.1.3. (Bandelt *et al.*, 1999). В ходе анализа полученных данных кроме описанных нами гаплотипов были использованы последовательности из NCBI: DQ399869–DQ399871, EU202651, EU202653, EU523949, EU523982, EU523983, EU523985–EU523987, HQ960660–HQ960663, JN629025–JN629029, JX960877, KC009645, KJ128463, KJ128464, KM286532, KM286534, KM286535, KM286537, KM286539–KM286542, KM286544, KM286545, KM286548, KM286552–KM286554, KM286556, KM286560, KM286561, KM286563, KM286566, KM286568–KM286570, KM286573, KM286574, KM286578, KM286581, KM286582, KM286588, KM286590, KM286591, KM286597, KM286605, KM286607, KT254043, KT254058, KT267305, KT630721, KU760909, KU760911–KU760913, KU867883.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Результаты анализа полиморфизма ND1-фрагмента мтДНК.* Длина проанализированного ND1-фрагмента мтДНК составила 1906 пар нуклеотидов (п. н.), из которых протяженность белок-кодирующего участка — 974 п. н. Нуклеотидный состав (%) последовательности ND1-фрагмента переславской ряпушки: аденин (24.73), тимин (25.25), цитозин (28.29), гуанин (21.73).

Последовательности ND1-фрагмента ряпушки оз. Плещеево были использованы для построения медианной сети гаплотипов (рис. 1). При построении сети в анализ были включены последовательности ряпушек *C. albula* и *C. sardinella* из других водоемов Европы и Сибири, а также гап-

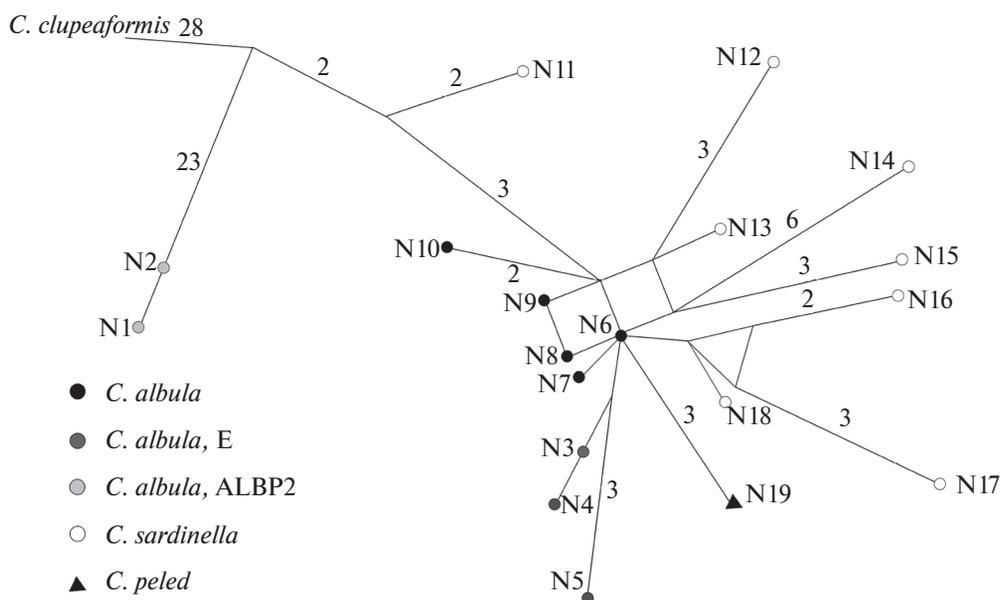


Рис. 1. Медианная сеть гаплотипов ND1-фрагмента мтДНК. Число нуклеотидных замен, если оно >1, указано рядом с отрезками, соединяющими гаплотипы; для рис. 1 и 2.

лотипы пеляди *C. peled* – вида, наиболее близкого к ряпушкам. Информация об этих последовательностях взята из базы данных NCBI. В целом проанализированы филогенетические отношения 19 гаплотипов, в анализ взят общий для всех последовательностей участок длиной 1906 п. н.

Оказалось, что нуклеотидные последовательности двух особей-носителей гаплотипа ALBP2 отличаются заменой в одной позиции (гаплотипы N1 и N2 на рис. 1). В целом же дифференциация между пятью вариантами последовательностей из популяции ряпушки оз. Плещеево (N1–N5) обусловлена нуклеотидными заменами в 32 полиморфных сайтах. Большая часть замен – транзиции (29) и лишь три – трансверсии (отношение транзиций к трансверсиям ( $R$ ) 9.36). Парсимониально-информативными, т.е. встречающимися не менее чем в двух последовательностях, оказались 28 сайтов. Все переменные сайты, за исключением одного, располагались в пределах кодирующего региона. Синонимичными оказались 29 замен; несинонимичными – две замены, которые приводили к точечным мутациям во второй позиции второго и 97-го кодонов. В результате обеих несинонимичных замен аминокислота изолейцин замещалась треонином.

Уровень внутрипопуляционной дифференциации гаплотипов ряпушки оз. Плещеево превышает даже межвидовой:  $p$ -дистанция между ними достигает 1.56%, в то время как, например, между гаплотипами пеляди и ряпушки из европейских водоемов – 0.23% (табл. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что ближайшее положение к

гаплотипам N1 и N2 на схеме занимает гаплотип ряпушки Сибири из бух. Буор-Хая (N11) (рис. 1).

Результаты анализа полиморфизма фрагмента *COI* мтДНК. Был проанализирован полиморфизм фрагмента *COI* мтДНК длиной 585 п. н. Нуклеотидный состав (%) *COI* переславской ряпушки: аденин (21.46), тимин (29.55), цитозин (30.61), гуанин (18.38). Проанализированные особи-носители гаплотипов E и ALBP2 согласно ПДРФ-анализу ND1-фрагмента, характеризовались тремя гаплотипами, причем все ряпушки филогенетической линии ALBP2 – одним вариантом (C2), а особи линии E – двумя (C3 и C4) (табл. 1). Эти гаплотипы различались нуклеотидными заменами в шести сайтах, пять из которых были парсимониальными. Все выявленные замены (пять транзиций и одна трансверсия ( $R = 4.53$ )) оказались синонимичными и не приводили к изменению аминокислотной последовательности белковой молекулы.

При построении медианной сети гаплотипов была использована информация о 58 последовательностях *COI* сигаевых рыб Европы, Сибири и Северной Америки из базы NCBI (рис. 2). Проанализирован общий для всех последовательностей участок длиной 522 п. н. Последовательности ряпушек, а также филогенетически близкой к ним пеляди, оказались отнесены к 21 гаплотипу.

Как и в случае ND1-фрагмента, уровень внутрипопуляционного полиморфизма ряпушки оз. Плещеево оказался высоким. Действительно, например, ряпушки оз. Брайтер Луцин (Германия), относимые к разным видам (*C. albula* и *C. lucinensis*), являются носителями или варианта C1, или

**Таблица 2.** *p*-Дистанции (%) между гаплотипами ND1-фрагмента мтДНК видов р. *Coregonus* и внутривидовых групп

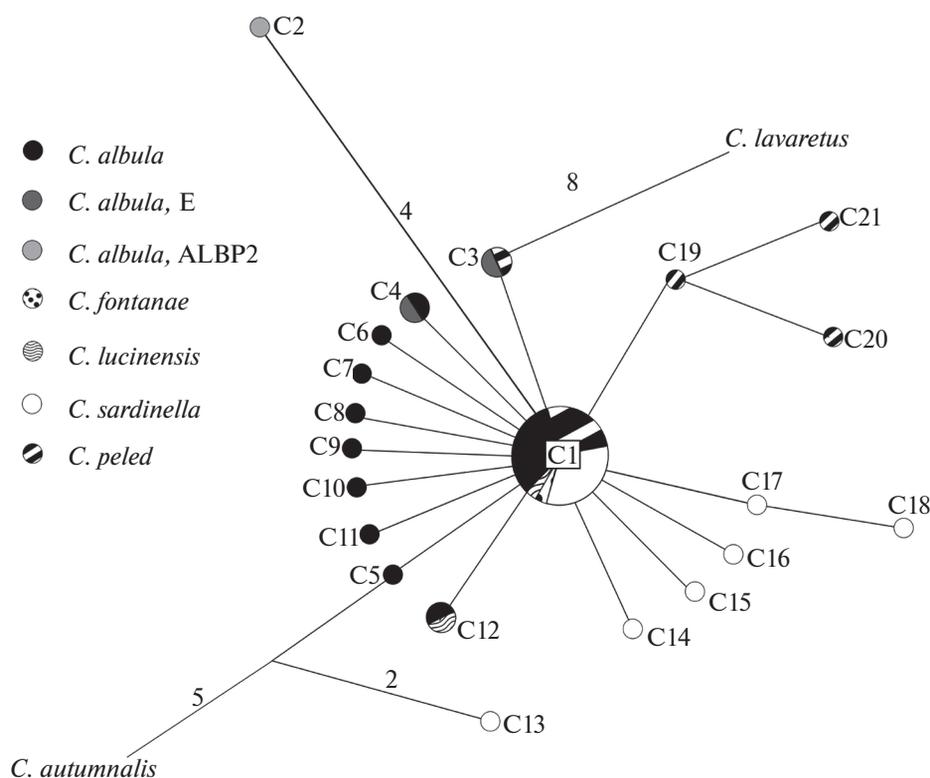
	CAPE	CAPALBP2	CAE	CS	CP	CL	CPD	CCLP
CAPE	0.18 ± 0.09	0.28	0.08	0.1	0.13	0.33	0.32	0.29
CAPALBP2	1.56	0.05 ± 0.06	0.28	0.27	0.3	0.35	0.34	0.32
CAE	0.23	1.5	0.13 ± 0.06	0.07	0.11	0.32	0.32	0.28
CS	0.39	1.62	0.29	0.4 ± 0.09	0.1	0.32	0.32	0.27
CP	0.32	1.48	0.23	0.36	0	0.34	0.34	0.3
CL	2.19	2.45	2.05	2.11	2.19	0.4 ± 0.09	0.08	0.21
CPD	2.1	2.34	1.97	2.02	2.1	0.44	0.38 ± 0.07	0.2
CCLP	1.85	2.16	1.71	1.81	1.85	1.22	1.13	0.11 ± 0.06

Примечание. CAE – *Coregonus albula*, носители гаплотипа E; CAPE – линия E, оз. Плещеево; CAPALBP2 – линия ALBP2, оз. Плещеево; CS – *C. sardinella*; CP – *C. peled*; CL – *C. lavaretus*; CPD – *C. lavaretus pidschian*; CCLP – *C. clupearformis*. Под диагональю – показатель межгрупповой дифференциации, над диагональю – ошибка показателя, по диагонали – внутривидовая дифференциация гаплотипов; для табл. 2 и 3.

вариантов, различающихся одной нуклеотидной заменой (C1 и C12) (рис. 2, табл. 3). В то же время уровень дифференциации между вариантами разных линий оз. Плещеево составил пять нуклеотидных замен, или 0.97% (гаплотипы C2 и C3, C4; рис. 2, табл. 3). Вариант C2 переславской ряпушки отличается от наиболее часто встречаемого C1 четырьмя заменами, тогда как различия вариантов последовательности ряпушек в большинстве

случаев не превышают одной нуклеотидной замены (рис. 2). Отметим, что дифференциация между ряпушками и такими “хорошими” видами, как сиг и омуль, варьирует от 1.47 до 2.61% (табл. 3).

В литературных источниках оценки внутри- и межвидового уровня различий для последовательности *COI* мтДНК рыб неоднозначны. Так, для рода *Coregonus* был приведен интервал межвидовых различий нуклеотидных последовательно-



**Рис. 2.** Медианная сеть гаплотипов *COI* мтДНК. Диаметр кругов, условно обозначающих гаплотипы, зависит от числа таксономических единиц, для которых характерен данный гаплотип. Видовые названия приведены согласно аннотации последовательностей в NCBI.

**Таблица 3.** *p*-Дистанции (%) между гаплотипами *COI* мтДНК видов р. *Coregonus* и внутривидовых групп

	CAPE	CA PALBP2	CAE	CA	CLUC	CS	CP	CL	CAUT
CAPE	0.19 ± 0.13	0.42	0.17	0.14	0.17	0.15	0.21	0.58	0.54
CAPALBP2	0.97	0	0.4	0.38	0.39	0.39	0.41	0.71	0.68
CAE	0.34	0.93	0.29 ± 0.16	0.08	0.12	0.09	0.18	0.59	0.51
CA	0.24	0.85	0.21	0.12 ± 0.07	0.09	0.06	0.15	0.58	0.5
CLUC	0.29	0.88	0.24	0.13	0.19 ± 0.18	0.1	0.18	0.59	0.53
CS	0.31	0.91	0.27	0.19	0.22	0.24 ± 0.09	0.16	0.58	0.52
CP	0.61	1.24	0.59	0.29	0.54	0.57	0.77 ± 0.24	0.6	0.52
CL	1.88	2.61	1.93	1.85	1.88	1.91	1.95	0	0.6
CAUT	1.62	2.24	1.47	1.54	1.49	1.51	1.71	2.03	0.1 ± 0.09

Примечание. CA – *Coregonus albula*, гаплотип по ND1-фрагменту не известен; CLUC – *C. lucinensis*; CAUT – *C. autumnalis*.

стей *COI* от 0.46 до 2.12% при среднем значении 1.56%, а уровень внутривидовой дифференциации варьировал от 0 до 0.77% (Schlei *et al.*, 2008). В результате штрихкодирования пресноводных рыб Германии для *C. albula* был установлен диапазон различий 0.37–1.74% (Knebelsberger *et al.*, 2015). Согласно данным для 190 видов рыб из 85 отрядов изменчивость последовательности *COI* внутри видов составила 0–7.42% при среднем значении 0.27% (Hubert *et al.*, 2008), а для пресноводных рыб Северной Америки средний показатель внутривидовой дифференциации равен 0.73% (Argil *et al.*, 2011).

Значительные различия ряда гаплотипов ND1-фрагмента и участка *COI* мтДНК от распространенных у переславской ряпушки вариантов заставляют усомниться в том, что эти гаплотипы возникли непосредственно в данном водоеме после заселения его ряпушкой несколько тысяч лет назад, и свидетельствуют об их древности. Отмеченные особенности позволяют предполагать существование в озере разных филогенетических линий ряпушки.

События плейстоцена с последовательными периодами похолодания и потепления климата, по-видимому, привели к тому, что в оз. Плещеево проникли две линии: более древняя, маркируемая гаплотипом ALBP2, и распространенная молодая, причем вселение линий могло происходить в разные временные периоды. Сосуществование в водоеме филогенетических линий, имеющих разное происхождение, можно рассматривать в качестве одной из причин, обуславливающих высокий уровень внутривидовой генетической полиморфизма этой уникальной популяции. Отметим, что значительная дифференциация последовательностей *COI* внутри ряда видов пресноводных рыб Северной Америки обсуждалась ранее (April *et al.*, 2011) и также связывалась с аллопатричным происхождением и независимой

эволюционной историей разных внутривидовых линий.

Таким образом, обнаруженные в оз. Плещеево значительно дифференцированные варианты последовательностей мтДНК ряпушки (гаплотип ALBP2 и его производные) маркируют филогенетическую линию, происхождение которой отличается от происхождения линии, широко распространенной в современных водоемах европейской территории России. Линия ALBP2 могла сформироваться еще до последнего оледенения в водоемах-рефугиумах Восточной Европы, где контактировали фауны сиговых рыб Европы и Сибири, существовал поток генов между сибирской и европейской ряпушками (Боровикова, 2009).

Автор выражает благодарность директору национального парка “Плещеево озеро” М.Ю. Федорову и коллективу парка за всестороннюю помощь в сборе материала, А.А. Махрову, Е.В. Расхожевой и Н.В. Черновой за предоставленные для работы образцы сиговых рыб других водоемов, а также И.С. Ворошиловой за ценные замечания и обсуждение текста. Работа выполнена при финансовой поддержке национального парка “Плещеево озеро” в рамках проекта “Комплексное исследование экосистемы оз. Плещеево”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1948. Ч. 1. 466 с.
- Борисов П.Г. Ряпушка озера Переславского // Тр. НИРХ. 1924. Т. 1. С. 53–127.
- Боровикова Е.А. Филогеография ряпушек *Coregonus albula* (L.) и *C. sardinella* Valenciennes Европейского Севера России: Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: РУДН, 2009. 24 с.
- Красная книга Российской Федерации (животные). М.: Астрель, 2001. 862 с.
- Решетников Ю.С. Экология сиговых рыб. М.: Наука, 1980. 300 с.

- Рыбы в заповедниках России. Т. 1. Пресноводные рыбы / Под ред. Решетникова Ю.С. М.: КМК, 2010. 628 с.
- April J., Mayden R.L., Hanner R.H., Bernatchez L. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108(26). P. 10602–10607.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16 (1). P. 37–48.
- Bochkarev N.A., Zuykova E.I., Katokhin A.V. Morphology and mitochondrial DNA variation of the Siberian whitefish *Coregonus lavaretus pidschian* (Gmelin) in the upstream water bodies of the Ob and Yenisei Rivers // Evol. Ecol. 2011. V. 25. P. 557–572.
- 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.
- Hubert N., Hanner R., Holm E., Mandrak N.E., Taylor E., Burridge M., Watkinson D., Dumont P., Curry A., Bentzen P., Zhang J., April J., Bernatchez L. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes // PLoS One. 2008. V. 3 (6). P. e2490.
- Ivanova N.V., Zemlak T.S., Hanner R.H., Hebert P.D.N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding // Mol. Ecol. Not. 2007. V. 7. P. 544–548.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. P. 111–120.
- Kneibelsberger T., Dunz A.R., Neumann D., Geiger M.F. Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding // Mol. Ecol. Res. 2015. V. 15 (3). P. 562–572.
- Politov D.V., Gordon N.Yu., Afanasiev K.I., Altukhov Yu.P., Bickham J.W. Identification of paleartic coregonid fish species using mtDNA and allozyme genetic markers // J. Fish Biol. 2000. V. 57. (Suppl. A). P. 51–71.
- Schlei O.L., Crête-Lafrenière A., Whiteley A.R., Brown R.J., Olsen J.B., Bernatchez L., Wenburg J.K. DNA barcoding of eight North American coregonine species // Mol. Ecol. Res. 2008. V. 8. P. 1212–1218.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species // Philos. Transact. Roy. Soc. B: Biol. Sci. 2005. V. 360. P. 329–356.

## Special Traits of the Genetic Structure and Origin of the Population of Vendace *Coregonus albula* of Pleshcheyevo Lake

E. A. Borovikova

*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences,  
Yaroslavl oblast, Nekouzskii raion, Borok, 152742 Russia*

*e-mail: elena.ibiw@gmail.com*

Nucleotide sequences of two regions of mitochondrial DNA are analyzed, that of the ND1-fragment and that of the fragment comprising a part of the cytochrome *c* oxidase gene. In the population of the vendace *Coregonus albula* from Pleshcheyevo Lake, there are specimens possessing haplotypes considerably differing from common variants of sequences represented both in the water body under consideration and in other water bodies of the European part of Russia. The level of intrapopulation polymorphism exceeds the level between species.