

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК



ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД ИМЕНИ И.Д. ПАПАНИНА РАН



Труды ИБВВ РАН, вып. 73 (76), 2016

*60-летию ИБВВ РАН посвящается*

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ГИДРОБИОНТОВ

УДК 581/591(063)  
ББК 28.59я4+28.69я4  
М75

**Молекулярная генетика гидробионтов** / [отв. ред. Б.А. Лёвин]. – Ярославль : Филигрань , 2016. – 78 с. – (РАН, Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина. Труды ; вып. 73(76).

*В. С. Артамонова, Е. А. Боровикова, И. С. Ворошилова, В. М. Голод, Е. С. Гусев, О. А. Ермаков, Р. И. Замалетдинов, А. Ю. Иванов, Д. А. Капустин, Б. А. Лёвин, Н. А. Мартыненко, А. А. Махров, Е. П. Симонов, А. И. Файзулин, В. А. Янковская*

В выпуск вошли статьи по молекулярной генетике гидробионтов, относимых к двум царствам — хромистам (золотистые водоросли) и животным (моллюски, рыбы и амфибии), подготовленные по материалам докладов, представленных на Международной конференции Актуальные проблемы изучения биологии внутренних вод, посвященной 60-летию Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. В статьях представлены как обзоры, так и более частные работы по применению молекулярных маркеров для определения видов или популяций (пород рыб), реконструкции филогенетических отношений и филогеографического анализа, таксономической ревизии ряда групп.

**Ответственный редактор тома**  
кандидат биологических наук **Б. А. Лёвин**

**Рецензенты:**

к.б.н. *Н. И. Абрамсон* – Зоологический Институт РАН  
к.б.н. *А. А. Махров* – Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова  
к.б.н. *В. В. Ярцев* – Томский Государственный Университет

**Редакционная коллегия Трудов ИБВВ РАН:**

<i>С. А. Поддубный (главный редактор)</i>	<i>А. А. Бобров</i>
<i>А. В. Крылов (зам. главного редактора)</i>	<i>В. И. Лазарева</i>
<i>А. Н. Дзюбан</i>	<i>В. К. Голованов</i>
<i>В. Т. Комов</i>	<i>Н. М. Минеева</i>

*Печатается по решению Ученого совета ИБВВ РАН  
Издание осуществлено при поддержке гранта РФФИ 16-04-20126*

**Molecular genetics of aquatic organisms** / [Editor-in-chief Boris A. Levin]. – Yaroslavl: Filigran, 2016. – 78 p. Transactions of I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, issue 73(76).

*V. S. Artamonova, E. A. Borovikova, I. S. Voroshilova, V. M. Golod, E. S. Gusev, O. A. Ermakov, R. I. Zamaletdinov, A. Y. Ivanov, D. A. Kapustin, B. A. Levin, N. A. Martynenko, A. A. Makhrov, E. P. Simonov, A. I. Fayzulin, V. A. Yankovskaya*

The issue includes papers on molecular genetics of aquatic organisms of different level of evolutionary organization belonging to two kingdoms – Chromista (Chrysophytes) and Animalia (mollusks, fishes, and amphibians). Both reviews and primary research papers concern different issues of species identification, molecular phylogeny and phylogeography, and taxonomy of certain groups.

**Editor-in-chief of the volume**  
**B. A. Levin**

**Reviewers:**

*Abramson N. I.* – Zoological Institute, Russian Academy of Sciences  
*Makhrov A. A.* – Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences  
*Yartsev V. V.* – Tomsk University

**Editorial board of IBIW RAS Transactions:**

<i>S. A. Poddubny (editor-in-chief)</i>	<i>A. A. Bobrov</i>
<i>A. V. Krylov (deputy chief editor)</i>	<i>V. I. Lazareva</i>
<i>A. N. Dzyuban</i>	<i>V. K. Golovanov</i>
<i>V. T. Komov</i>	<i>N. M. Mineeva</i>

*Published by the decision of IBIW RAS Academic council*

*The book is published by the grant RFBR 16-04-20126*

## СОДЕРЖАНИЕ

*Гусев Е.С., Капустин Д.А., Мартыненко Н.А.*

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВ РОДА  
*SYNURA* EHRENW. (CHRYSORHYNCEAE) ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ИБВВ РАН 5

*Ворошилова И.С.*

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕ-  
ТОДОВ ДЛЯ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ РЕВИЗИИ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ 12

*Артамонова В.С., Янковская В.А., Голод В.М., Махров А.А.*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОРОД РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*PARASALMO*  
*MUKISS*), РАЗВОДИМЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ 25

*Боровикова Е.А.*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМ ФИЛО-  
ГЕНИИ И ФИЛОГЕОГРАФИИ СИГОВЫХ РЫБ (*COREGONIDAE*) 46

*Лёвин Б.А.*

О ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОМ ПОЛОЖЕНИИ ЕЛЬЦА ДАНИЛЕВСКОГО *LEUCISCUS*  
*DANILEWSKII* (CYPRINIDAE) ПО ДАННЫМ МТ ДНК 64

*Ермаков О.А., Симонов Е.П., Иванов А.Ю., Замалетдинов Р.И., Файзулин А.И.*

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS COMPLEX*)  
ЗАПАДНОГО КАВКАЗА ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЯДЕРНОЙ  
ДНК 70

## CONTENTS

<i>Gusev E.S., Kapustin D.A., Martynenko N.A.</i> MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES OF THE GENUS <i>SYNURA</i> EHRENB. (CHRYSTOPHYCEAE) FROM THE ALGAE CULTURE COLLECTION OF IBIW RAS	5
<i>Voroshilova I.S.</i> PROBLEMS AND PROSPECTS OF MOLECULAR-GENETIC METHODS APPLICATION FOR TAXONOMIC REVISION OF FRESHWATER MOLLUSKS	12
<i>Artamonova V.S., Yankovskaya V.A., Golod V.M., Makhrov A.A.</i> GENETIC DIFFERENTIATION OF RAINBOW TROUT ( <i>PARASALMO MYKISS</i> ) STRAINS BRED IN THE RUSSIAN FEDERATION	25
<i>Borovikova E.A.</i> USE OF MOLECULAR GENETIC MARKERS IN PHYLOGENY AND PHYLOGEOGRAPHY OF COREGONID FISHES	46
<i>Levin B.A.</i> PHYLOGENY OF <i>LEUCISCUS DANILEWSKII</i> (CYPRINIDAE) AS INFERRED FROM MTDNA ANALYSIS	64
<i>Ermakov O.A., Simonov E.P., Ivanov A.Ju., Zamaletdinov R.I., Fayzulin A.I.</i> GENETIC CHARACTERISTICS OF MARSH FROG ( <i>PELOPHYLAX RIDIBUNDUS</i> COM- PLEX) FROM THE WESTERN CAUCASUS BASED ON MITOCHONDRIAL AND NU- CLEAR DNA DATA	70

УДК 582.26.2

## МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВ РОДА *SYNURA* EHRENB. (CHRYSOPHYCEAE) ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ИБВВ РАН

Е. С. Гусев<sup>1</sup>, Д. А. Капустин<sup>1</sup>, Н. А. Мартыненко<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., 152742; e-mail: [algogus@yandex.ru](mailto:algogus@yandex.ru)

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, 614068, Букирева 15.

<sup>3</sup>Пермское отделение ФГБНУ «ГосНИОРХ», Пермь, 614002, Чернышевского 3

В коллекции ИБВВ РАН депонировано 25 штаммов, принадлежащих к 4 видам рода *Synura*: *S. petersenii* sensu stricto, *S. glabra*, *S. macropora* и *S. echinulata*. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии проведена их видовая идентификация и изучена морфология чешуек. Молекулярно-генетический анализ на основе внутреннего транскрибируемого спейсера рДНК (ITS rDNA) позволил достоверно подтвердить идентификацию *S. macropora*, нового вида для России, который раньше рассматривался в составе псевдокриптического комплекса видов *S. petersenii* sensu lato, а также подтвердить идентификацию остальных видов рода *Synura*.

**Ключевые слова:** золотистые водоросли, коллекция культур BOROK WDCM602, *Synura*, чешуйки, морфология, молекулярно-генетический анализ, ITS rDNA.

### ВВЕДЕНИЕ

К роду *Synura* Ehrenb. принадлежат колониальные свободно плавающие золотистые водоросли. Колонии их более или менее округлые, состоят из 2–180 шаровидных до удлиненно-обратно-яйцевидных клеток, соединенных оттянутыми задними концами (Балонов, 1976; Kristiansen, Preisig, 2007). Каждая клетка покрыта панцирем из кремнеземных чешуек, морфология которых является видоспецифичной. К настоящему времени известно 38 видов рода *Synura* (Kauptin, Gusev, 2015).

В 2010 г. две группы исследователей независимо друг от друга обнаружили в составе морфотаксона *Synura petersenii* Korshikov sensu lato комплекс криптических видов (Boo et al., 2010; Kynčlová et al., 2010). Лишь недавно удалось провести с использованием полифазного подхода масштабную ревизию этого комплекса (Škaloud et al., 2012, 2014). До настоящего времени молекулярно-генетические исследования рода *Synura*, равно как и ревизия находок *Synura petersenii* sensu lato на территории России и сопредельных стран не проводились.

Цель работы — провести морфологический и молекулярно-генетический анализ на основе внутреннего транскрибируемого спейсера рДНК (ITS rDNA) штаммов из коллекции ИБВВ РАН (BOROK WDCM602), относящихся к роду *Synura*.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Пробы отбирали в водоёмах различного типа на территории России и Украины в течение 2013–2015 гг. (табл. 1). Для отбора проб использовали планктонную сеть с ячейкой 20 мкм. Из нефиксированных проб пипеткой вы-

деляли отдельные клетки, промывали в каплях стерилизованной воды и помещали в лунку (300 мкл) планшета для иммуоферментного анализа. После трех недель роста альгологически чистые культуры переносили в чашки Петри диаметром 40 мм. Для выращивания водорослей использовали среду Waris-H (McFadden, Melkonian, 1986) с буфером TRIS вместо HEPES. Через месяц роста культуры переносили на сетки, покрытые формваровой плёнкой (EMS FF200-Cu-50, Electron Microscopy Sciences). После подсушивания сетки промывали 5–7 раз в каплях дистиллированной. Для изучения использовали трансмиссионный электронный микроскоп JEM-100C.

ПЦР проводили в объёме 25 мкл с использованием набора Screen Mix PK-141 компании Eurogen и праймеров ITS1 и ITS4, приведенных в работе White с соавторами (1990). Цикл ПЦР включал в себя стадии денатурации (30 сек. при 94°C), отжига праймеров (30 сек. при 54°C) и элонгации (45 сек. при 72°C), всего 30 циклов. Секвенирование проводили в ИБВВ РАН с использованием автоматизированного капиллярного анализатора ABI PRISM 3500. Редактирование и сборку консенсусной последовательности осуществляли путём визуального сопоставления прямой и обратной хроматограмм с помощью программ FinchTV (<http://geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) и MEGA 6 (Tamura и др., 2013). Для построения филогенетического дерева и последующего анализа использовали нуклеотидные последовательности ITS rDNA, взятые из базы данных GenBank (табл. 2). Для анализа использовали последовательности длиной 426 нуклеотидов.

**Таблица 1.** Места отбора проб

Страна, область	Водоём	Координаты	Дата	Сбор проб
Россия, Ярославская обл., окрестности пос. Борок	болото	58°3.184' с.ш. 38°14.885' в.д.	05.11.2015	Гусев Е.С., Капустин Д.А.
Россия, Ярославская обл., окрестности пос. Борок	пруд	58°3.162' с.ш. 38°14.836' в.д.	05.11.2015	Гусев Е.С., Капустин Д.А.
Россия, Ярославская обл., окрестности пос. Борок	пойменный водоём	58°3.921' с.ш. 38°15.016' в.д.	05.11.2015	Гусев Е.С., Капустин Д.А.
Россия, Ярославская обл., окрестности пос. Борок	Рыбинское вдхр., канал	58°3.907' с.ш. 38°15.109' в.д.	23.10.2013, 05.11.2015	Гусев Е.С., Капустин Д.А.
Россия, Ярославская обл., окрестности пос. Борок	канал, соединённый с Рыбинским вдхр.	58°4.056' с.ш. 38°14.842' в.д.	05.11.2015	Гусев Е.С., Капустин Д.А.
Россия, Ярославская обл., окрестности пос. Борок	мелиоративный канал	58°4.119' с.ш. 38°14.955' в.д.	05.11.2015	Гусев Е.С., Капустин Д.А.
Россия, Ярославская обл., окрестности д. Варегово	Карьер на месте тофроразработок	57°44.490' с.ш. 39°13.045' в.д.	17.05.2015	Гусев Е.С.
Россия, г. Нижний Новгород	р. Черная, ст. 1	56°23.695' с.ш. 43°46.406' в.д.	19.10.2015	Перминова О.С.
Россия, г. Нижний Новгород	р. Черная, ст. 2	56°23.065' с.ш. 43°50.247' в.д.	19.10.2015	Перминова О.С.
Россия, Владимирская обл., г. Гусь-Хрустальный	водохранилище	55°37.058' с.ш. 40°39.946' в.д.	19.05.2015	Гусев Е.С.
Россия, Владимирская обл., Гусь-Хрустальный р-н	р. Польш	55°35.673' с.ш. 40°22.918' в.д.	12.10.2013	Гусев Е.С.
Украина, Житомирская обл., окрестности с. Селезовка	оз. Грибово	51°30.052' с.ш. 28°6.391' в.д.	25.03.2015	Капустин Д.А.
Украина, Житомирская обл., окрестности с. Селезовка	пруд на р. Болотница	51°30.052' с.ш. 28°6.391' в.д.	25.03.2015	Капустин Д.А.

**Таблица 2.** Номера в базе GenBank последовательностей ITS rDNA, использованных в работе

Вид	Штамм	Номер в базе GenBank
<i>Synura petersenii</i>	S 89.D6	HG514231.1
<i>Synura petersenii</i>	S 89.F9	HG514232.1
<i>Synura petersenii</i>	CCMP 872	AF308835.1
<i>Synura petersenii</i>	SAG 120.79	AF308834.1
<i>Synura petersenii</i>	CCAP960/3	GU338143.1
<i>Synura glabra</i>	S 14.1	FM178514.1
<i>Synura glabra</i>	Jakeunmeok052407B	KP268728.1
<i>Synura conopea</i>	S 103.B3.	HG514195.1
<i>Synura conopea</i>	Gonggeomji4031909C	KP268692.1
<i>Synura truttae</i>	Jangjuk032611J	KP268703.1
<i>Synura hibernica</i>	S IE 103.C8	HG514214.1
<i>Synura hibernica</i>	S IE E8	HG514213.1
<i>Synura heteropora</i>	S 112.E2	HG514202.1
<i>Synura heteropora</i>	S 117.G6	HG514205.1
<i>Synura heteropora</i>	S 20.45	HG514198.1
<i>Synura borealis</i>	S 115.F4	HG514191.1
<i>Synura borealis</i>	S 115.G3	HG514192.1
<i>Synura laticarina</i>	S 115.E5	HG514227.1
<i>Synura laticarina</i>	S 113.E5	HG514224.1
<i>Synura americana</i>	Chimu112407C	KP268712.1
<i>Synura americana</i>	Johae010508F	KP268711.1
<i>Synura macropora</i>	S 71.B4	HG514230.1
<i>Synura macropora</i>	S 5.1.	FM178494.1
<i>Synura echinulata</i>	CCMP853	KP268754.1
<i>Synura echinulata</i>	SAG15.92	GU338154.1
<i>Synura mammillosa</i>	Santaek072410C	KP268750.1
<i>Synura mammillosa</i>	S19	KP268749.1
<i>Synura mammillosa</i>	S18	KP268748.1
<i>Synura mammillosa</i>	SIE105A	KP268753.1

Для построения филогенетических деревьев использовали байесовский подход (Bayesian Inference, далее BI) с использованием программы Mr. Bayes 3.2.4 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Параметры эволюционной модели нуклеотидных последовательностей оценивали в программе MEGA 6, наиболее подходящей была выбрана GTR+G+I. Для BI выбраны следующие параметры: случайное начальное дерево (random start tree), количество запусков (nruns) — 2, число параллельных цепочек (nchains) — 5, количество поколений (ngen) — 1000000, запись параметров каждого сотого поколения (samplefreq), параметры от-

жига (burn in) — 25%. Просмотр и редактирование деревьев осуществляли в программе FigTree 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего было проанализировано 25 штаммов из 12 водоёмов (табл. 3). На рисунках 1–15 приведены фотографии чешуек отдельных штаммов, подтверждающие находки обсуждаемых видов для конкретного водоёма. Идентичные по нуклеотидным последовательностям штаммы из одного водоёма (повторяющиеся штаммы) не отличались морфологически и не приведены на рисунках.

**Таблица 3.** Список штаммов видов рода *Synura* в коллекции ИБВВ РАН

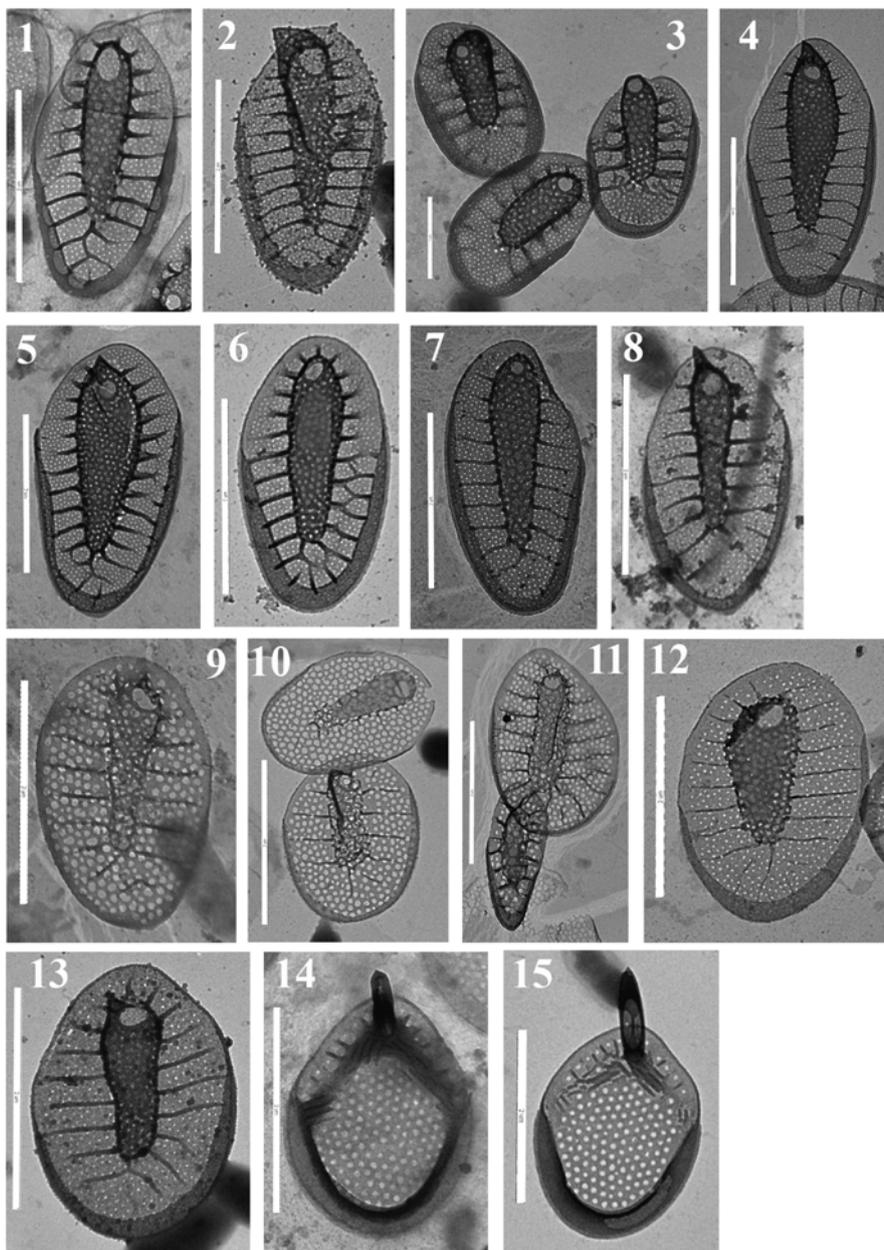
Штамм	Вид	Дата сбора	Местообитание
BOROK R020	<i>Synura petersenii</i>	12.10.2013	карьер на месте торфоразработок
BOROK R024	<i>Synura petersenii</i>	12.10.2013	карьер на месте торфоразработок
BOROK R030	<i>Synura petersenii</i>	25.03.2015	оз. Грибово
BOROK R036	<i>Synura petersenii</i>	25.03.2015	оз. Грибово
BOROK R039	<i>Synura petersenii</i>	25.03.2015	пруд на р. Болотница
BOROK R041	<i>Synura petersenii</i>	25.03.2015	оз. Грибово
BOROK R044	<i>Synura glabra</i>	05.01.2015	Рыбинское вдхр.
BOROK R046	<i>Synura petersenii</i>	17.05.2015	карьер на месте торфоразработок
BOROK R048	<i>Synura petersenii</i>	19.05.2015	водохранилище, г. Гусь-Хрустальный
BOROK R049	<i>Synura petersenii</i>	19.05.2015	водохранилище, г. Гусь-Хрустальный
BOROK R050	<i>Synura petersenii</i>	19.05.2015	водохранилище, г. Гусь-Хрустальный
BOROK R051	<i>Synura petersenii</i>	19.05.2015	водохранилище, г. Гусь-Хрустальный
BOROK R059	<i>Synura glabra</i>	19.10.2015	р. Черная
BOROK R060	<i>Synura petersenii</i>	19.10.2015	р. Черная
BOROK R061	<i>Synura petersenii</i>	19.10.2015	р. Черная
BOROK R062	<i>Synura petersenii</i>	19.10.2015	р. Черная
BOROK R081	<i>Synura petersenii</i>	05.11.2015	болото
BOROK R082	<i>Synura petersenii</i>	05.11.2015	пойменный водоём
BOROK R083	<i>Synura petersenii</i>	05.11.2015	пойменный водоём
BOROK R084	<i>Synura macropora</i>	05.11.2015	Рыбинское водохранилище
BOROK R086	<i>Synura macropora</i>	05.11.2015	пруд
BOROK R088	<i>Synura echinulata</i>	05.11.2015	пруд
BOROK R089	<i>Synura echinulata</i>	05.11.2015	канал, соединённый с Рыбинским вдхр.
BOROK R090	<i>Synura macropora</i>	05.11.2015	мелиоративный канал
BOROK R103	<i>Synura petersenii</i>	23.10.2013	Рыбинское водохранилище

Наиболее распространённый вид, представленный наибольшим числом штаммов и в большинстве изученных водоёмов — *Synura petersenii* Korshikov emend. Škaloud et Kynčlová (рис. 1–8), что согласуется с литературными данными (Kristiansen, Preisig, 2007). Первоначально, чешуйки этого вида были проиллюстрированы Б. Петерсеном (Petersen, 1918), которые автор, однако, отнес к *Synura uvella* Ehrenb. Позже, А.А. Коршиков в своей ревизии рода *Synura* (Korshikov, 1929) описал новый вид, назвав его в честь Петерсена. Долгое время вид считался полиморфным и включал несколько форм (*S. petersenii* f. *asmundiae* Cronberg et Kristiansen, *S. petersenii* f. *bjorkii* Cronberg et Kristiansen, *S. petersenii* f. *bonaerensis* Vigna, *S. petersenii* f. *columnata* Siver, *S. pe-*

*tersenii* f. *kufferathii* J.B Petersen et J.B. Hansen, *S. petersenii* f. *prae fracta* Asmund, *S. petersenii* f. *taymyrensis* Kristiansen, *S. petersenii* f. *truttae* Siver). Подробный морфологический анализ с применением трансмиссионного и сканирующего электронных микроскопов в совокупности с молекулярно-генетическими исследованиями позволили уточнить видовой диагноз (Škaloud et al., 2012). При этом часть внутривидовых таксонов были сведены в синонимы (напр., *S. petersenii* f. *kufferathii*, *S. petersenii* f. *bonaerensis*), а часть — переведены в ранг вида (напр., *S. truttae* (Siver) Škaloud et Kynčlová, *S. asmundiae* (Cronberg et Kristiansen) Škaloud et al., *S. bjorkii* (Cronberg et Kristiansen) Škaloud et al.) Таксономические преобразования не проведены лишь для тех таксонов, для

которых отсутствуют молекулярно-генетические данные (*S. petersenii* f. *columnata*, *S. petersenii* f. *taymyrensis* и *S. petersenii* f. *prae-*

*fracta*), но уже сейчас очевидно, что они не принадлежат к *S. petersenii* sensu stricto и, скорее всего, являются самостоятельными видами.



**Рис. 1–8.** *Synura petersenii*: 1 — штамм R041, 2 — штамм R046, 3 — штамм R050, 4 — штамм R060, 5 — штамм R081, 6 — штамм R082, 7 — штамм R083, 8 — штамм R103.

**Рис. 9–11.** *Synura macropora*: 9 — штамм R084, 10 — штамм R086, 11 — штамм R090.

**Рис. 12, 13.** *Synura glabra*: 12 — штамм R044, 13 — штамм R059.

**Рис. 14, 15.** *Synura echinulata*: 14 — штамм R088, 15 — штамм R089.

Шкала: рис. 3 — 1 мкм, рис. 1–2, 4–15 — 2 мкм.

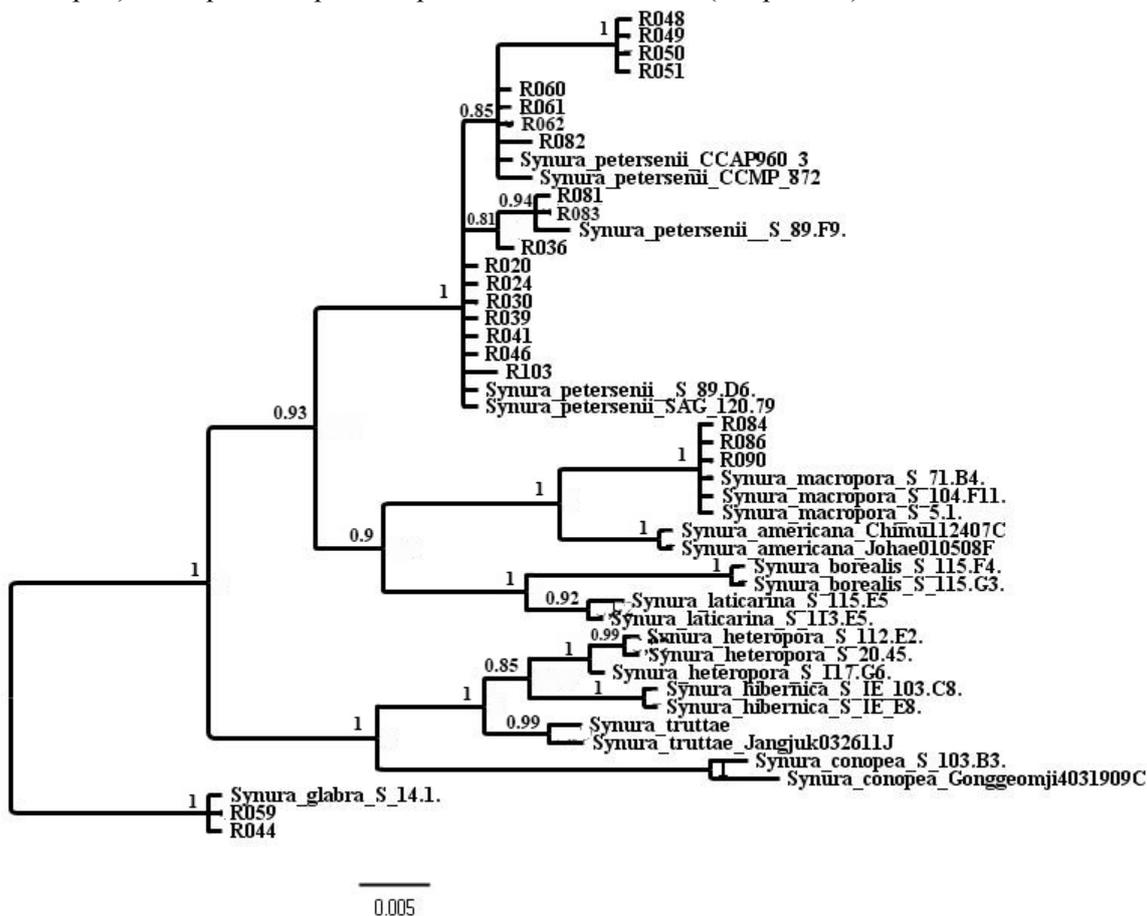
Клетки *Synura petersenii* грушевидные, длиной 20–31 мкм, шириной 8–12 мкм, полностью покрыты ланцетовидными чешуйками. Чешуйки тела удлинённые, длиной 3.6–4.6 мкм, шириной 1.8–2.3 мкм. Цилиндрический медиальный гребень часто заканчивается острием; орнаментирован мелкими порами (диаметр 0.045–0.071 мкм). Соотношение ширины чешуйки к ширине гребня — 2.7–3.8. Базальная пластинка орнаментирована многочислен-

ными мелкими порами (диаметр 0.019–0.030 мкм). Диаметр поры в передней части базальной пластинки 0.24–0.36 мкм. Многочисленные поперечные ребра (26–34) часто соединяются поперечными перегородками (Škaloud et al., 2012).

*Synura petersenii* Korshikov emend. Škaloud et Kynčlová впервые подтверждён электронно-микроскопическими и молекулярно-генетическими исследованиями на терри-

тории Украины. В России *Synura petersenii* sensu lato с формами часто упоминалась во флористических работах ранее. После проведения ревизии группы в 2012 г. (Škaloud et al., 2012), часть находок следует отнести к другим видам. В настоящей работе впервые молекулярно-генетическими методами подтверждены находки этого вида в бассейне Волги, в частности, непосредственно в Рыбинском водохранилище, водоёмах из затопляемой зоны Рыбинского водохранилища и р. Чёрной (г. Нижний Новгород) — правом притоке р. Волга

(рис. 16). Стоит отдельно отметить штаммы *Synura petersenii* из водохранилища г. Гусь-Хрустального (штаммы R048, R049, R050, R051), чешуйки которого были нетипичными для данного вида по строению (см. рис. 3). Они отличались большей шириной, чем в диагнозе для вида, и по форме были широко овальными, а не ланцетовидными. Эти четыре штамма составили отдельную кладу внутри группы *Synura petersenii* sensu stricto при сравнении нуклеотидных последовательностей ITS rDNA (см. рис. 16).



**Рис. 16.** Филогенетическое древо для видов комплекса *Synura petersenii*, построенное на основе последовательностей ITS rDNA методом BI. В узлах — значения апостериорных вероятностей. Шкала — число замен на сайт.

*Synura glabra* Korshikov emend. Škaloud et Kynčlová (рис. 12, 13) представлена в коллекции двумя штаммами. Один был выделен из Рыбинского водохранилища, второй — из р. Чёрной (г. Нижний Новгород). Таксон был описан в 1929 г. (Korshikov, 1929) и часто включался в ранге разновидности или формы в состав *Synura petersenii* (Huber-Pestalozzi, 1941; Kristiansen, Preisig, 2007). Проведённые молекулярно-генетические исследования показали обоснованность выделения самостоятельного вида (Škaloud et al., 2012). Клетки сферические до грушевидных, длиной 19–28 мкм, шириной 10–14 мкм, в колонии сгруппированы очень тесно. Чешуйки тела овальные до почти сферических, длиной 2.4–3.4 мкм, шириной 1.5–

2.4 мкм. Медиальный гребень обычно очень узкий, орнаментирован средними по размеру порами (диаметр 0.066–0.100 мкм). Соотношение ширины чешуйки к ширине гребня — 3.6–5.0. Базальная пластинка орнаментирована порами (диаметр 0.029–0.040 мкм). Диаметр поры в передней части базальной пластинки 0.14–0.32 мкм. Поперечные ребра редуцированы или отсутствуют, никогда не пересекаются продольными перегородками, число их варьирует от 17 до 22.

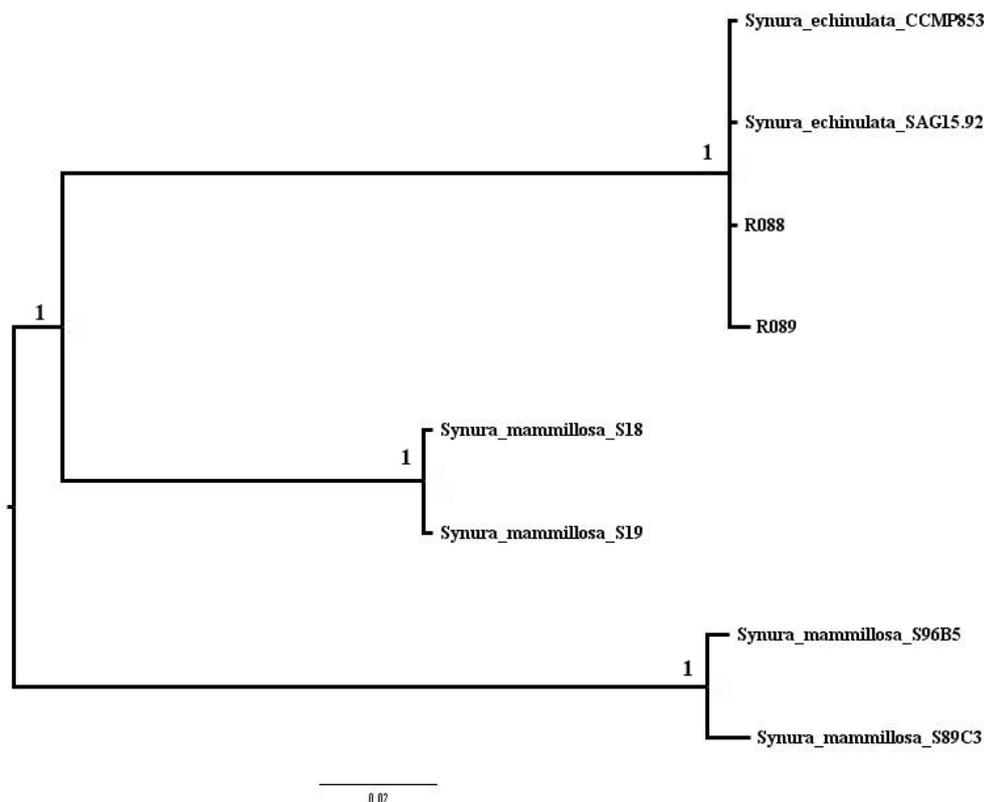
Анализ ITS rDNA подтвердил идентификацию по морфологическим критериям двух выделенных штаммов (см. рис. 16). Предыдущие находки в России (Балонов, Кузьмин, 1974; Балонов, 1976; Кузьмин, Кузьмина, 1987;

Voloshko, 2010) следует отнести к *S. macropora* (см. ниже). Таким образом, представленные в работе штаммы — первые подтвержденные находки данного вида на территории России.

В ходе работ было установлено, что 3 штамма относятся к виду *Synura macropora* Škaloud et Kynčlová (рис. 9–11). Вид был описан в 2012 г. (Škaloud et al., 2012). Клетки грушевидные, длиной 18–25 мкм, шириной 8–12 мкм. Чешуйки тела округлые, длиной 2.6–3.5 мкм, шириной 1.5–2.2 мкм. Медиальный гребень заканчивается острием. Медиальный гребень орнаментирован большими порами (диаметр 0.085–0.137 мкм). Соотношение ширины чешуйки к ширине гребня — 2.7–3.6. Базальная пластинка орнаментирована отчетливыми, большими порами (диаметр 0.053–0.077 мкм). Диаметр поры в передней части базальной пластинки 0.16–0.33 мкм. Поперечные ребра могут быть короткими или вовсе отсутствовать, число их варьирует от 17 до 21.

*Synura macropora* можно считать условно новым видом для России, поскольку ранее чешуйки данного таксона отмечались для водоемов страны, но под названием *S. petersenii* f. *glabra* (Балонов, Кузьмин, 1974; Балонов, 1976; Кузьмин, Кузьмина, 1987; Voloshko, 2010).

*Synura echinulata* Korshikov (рис. 14–15). Передние чешуйки панциря эллипсоидные или овальные (длиной 3.0–3.4 мкм, шириной 2.3–2.6 мкм) с хорошо выраженной областью червеобразно извитых гребней. Шип острый, длиной 1.0–2.0 мкм, толщиной 0.43–0.6 мкм, в основании с порой диаметром 0.2–0.25 мкм. Базальная пластинка мелко перфорирована. Чешуйки клеток у штаммов из коллекции ИБВВ РАН по морфологии (относительно узкая область червеобразноизвитых гребней) сходны с другим видом *S. leptorrhabda* (Asmund) К.Н. Nicholls (ранее таксон считался формой *S. echinulata*), но поскольку аутентичного штамма последнего вида не существует в мировых коллекциях культур, подтвердить его видовую самостоятельность молекулярно-генетическими методами невозможно. Требуются дополнительные исследования морфологической изменчивости обсуждаемых видов в культуре и природных популяциях для подтверждения самостоятельности *S. leptorrhabda*. При анализе нуклеотидных последовательностей участка ITS rDNA оба штамма объединяются в одну кладу со штаммами из коллекций ССМР и SAG, идентифицированными как *Synura echinulata* (рис. 17).



**Рис. 17.** Филогенетическое древо для видов комплекса *Synura echinulate* / *mammillosa*, построенное на основе последовательностей ITS rDNA методом BI. В узлах — значения апостериорных вероятностей. Шкала — число замен на сайт.

Таким образом, в коллекции ИБВВ РАН в настоящее время представлены 4 вида из рода *Synura* из водоемов Европейской части России и Украины. Дальнейшие работы будут направлены на пополнение коллекции новыми штаммами. Особенный интерес представляет

выделение в культуру двух видов рода *Synura*, описанных И.М. Балоновым из Рыбинского водохранилища — *S. biseriata* Balonov и *S. punctulosa* Balonov (Балонов, 1976), для проведения молекулярно-генетических исследований и выяснения их места в системе рода.

Авторы выражают благодарность сотрудникам центра коллективного пользования электронной микроскопии ИБВВ РАН за помощь в работе с микроскопами, доктору Pavel Škaloud за консультации при определении видов и О.С. Перминовой за сбор проб в г. Нижний Новгород.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ 15-29-02739 офи\_м.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балонов И.М. Род *Synura* Ehr. (Chrysophyta): биология, экология, систематика // Биология, морфология и систематика водных организмов. Л.: Наука, 1976. С. 61–81. Balonov I.M. Rod *Synura* Ehr. (Chrysophyta): biologia, ecologia i sistematika // Biologia, morfologia i sistematika vodnykh organizmov. L.: Nauka, 1976. S. 61–81. [Balonov I.M. Genus *Synura* Ehr. (Chrysophyta): biology, ecology and systematics // Biology, morphology and systematics of the aquatic organisms. Leningrad: Science, 1976. P. 61–81]. In Russian.
- Балонов И.М., Кузьмин Г.В. Виды рода *Synura* Ehr. (Chrysophyta) в водохранилищах Волжского каскада // Ботан. журнал. 1974. Т. 59. № 11. С. 1675–1686. Balonov I.M., Kuzmin G.V. Vidy roda *Synura* Ehr. (Chrysophyta) v vodokhranilischakh Volzhskogo kaskada // Botanicheskiy zhurnal. T. 59. № 11. S. 1675–1686. [Balonov I.M., Kuzmin G.V. Species of the genus *Synura* Ehr. (Chrysophyta) in water reservoirs of the Volga cascade // Botanical journal. V. 59. № 11. P. 1675–1686]. In Russian.
- Кузьмин Г.В., Кузьмина В.А. Панцирные представители золотистых водорослей из Магаданской области // Новости систем. низш. раст. 1987. Т. 24. С. 40–42. Kuzmin G.V., Kuzmina V.A. Pancyrnye predstaviteli zolotistykh vodorosley iz Magadanskoj oblasti // Novosti sistematiki nizshykh rasteniy. 1987. T. 24. S. 40–42. [Kuzmin G.V., Kuzmina V.A. Chrysophyta frustulata e prov. Magadan // Novitates systematicae plantarum non vascularium. 1987. T. 24. P. 40–42]. In Russian.
- Boo S.M., Kim H.S., Shin W. et al. Complex phylogeographic patterns in the freshwater alga *Synura* provide new insights into ubiquity vs. endemism in microbial eukaryotes // Molecular Ecology. 2010. 19. P. 4328–4338.
- Huber-Pestalozzi G. Chrysophyceen. Farblose Flagellaten. Heterokonten // Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 2 T. 1 H. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlag., 1941. 365 S.
- Kapustin D.A., Gusev E.S. *Synura korshikovii* sp. nov. (Chrysophyceae, Synurales), a new species from Ukraine // Phytotaxa. 2015. 233 (2). P. 185–190. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.233.2.6>
- Korshikov A.A. Studies on the Chrysonomads. I // Arch. Protistenk. 1929. 67. S. 253–290.
- Kristiansen J., Preisig H.R. Chrysophyte and Haptophyte Algae. Part 2: Synurophyceae // Süßwasserflora von Mitteleuropa. Vol. 1/2. Berlin: Springer-Verlag, 2007. 252 p.
- Kynčlová A., Škaloud P., Škaloudová M. Unveiling hidden diversity in the *Synura petersenii* species complex (Synurophyceae, Heterokontophyta) // Nova Hedwigia, Beih. 2010. 136. P. 283–298.
- McFadden G.I., Melkonian M. Use of HEPES buffer for algal culture media and electron microscopy // Phycologia. 1986. 25. P. 551–557.
- Škaloud P., Kynčlová A., Benada O., Kofroňová O., Škaloudová M. (2012) Toward a revision of the genus *Synura*, section *Petersenianae* (Synurophyceae, Heterokontophyta): morphological characterization of six pseudo-cryptic species // Phycologia. 2012. 51. P. 303–329. <http://dx.doi.org/10.2216/11-20.1>
- Škaloud P., Škaloudová M., Procházková A., Němcová Y. Morphological delineation and distribution patterns of four newly described species within the *Synura petersenii* species complex (Chrysophyceae, Stramenopiles) // Eur. J. Phycol. 2014. 49 (2). P. 213–229. <http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2014.905710>
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Mol. Biol. and Evol. 2013. 30. P. 2725–2729.
- Voloshko L.N. The chrysophycean algae from glacial lakes of Polar Ural (Russia) // Nova Hedwigia, Beih. 2010. 136. P. 191–211.
- White, T. J., T. D.Bruns, S. B.Lee, J. W.Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics / In: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego. 1990. P. 315–322.

#### MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES OF THE GENUS *SYNURA* EHRENB. (CHRYSOPHYCEAE) FROM THE ALGAE CULTURE COLLECTION OF IBIW RAS

E. S. Gusev<sup>1</sup>, D. A. Kapustin<sup>1</sup>, N. A. Martynenko<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences. Russia, 152742 Yaroslavl, Nekouz, Borok, e-mail: [algogus@yandex.ru](mailto:algogus@yandex.ru)*

<sup>2</sup>*Perm State University, Perm, 614068, Bukireva, 15*

<sup>3</sup>*GosNIORKH, Perm Branch, Perm, 614002, Chernyshevskogo, 3*

Twenty five strains of *Synura* are deposited at the algae culture collection BOROK WDCM602. They represent four species: *Synura petersenii* s. str., *S. glabra*, *S. macropora* and *S. echinulata*. Scanning and transmission electron microscopy were used for scale's ultrastructure studies and for initial species identification. ITS rDNA marker was used for confirmation of identification. Based on this marker, all studied taxa were identified correctly including *Synura macropora*, which was reported for the first time for Russia.

**Keywords:** Chrysophyceae, algae culture collection BOROK WDCM602, *Synura*, scale morphology, molecular studies, ITS rDNA.

## ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ РЕВИЗИИ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ

И. С. Ворошилова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: issergeeva@yandex.ru*

В систематике существуют две противоположные тенденции — дробление и объединение таксонов. В отечественной системе пресноводных моллюсков в настоящее время преобладает первая из этих тенденций, тогда как в зарубежных исследованиях — вторая. В публикации рассмотрены проблемы и перспективы применения молекулярно-генетических методов для таксономической ревизии моллюсков.

*Ключевые слова:* пресноводные моллюски, ДНК, систематика.

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение естественной фильтрации вод, питания водных и некоторых наземных животных, накопления токсических соединений в их тканях, функционирования паразитарных систем — это далеко не полный перечень исследований, в ходе которых возникает необходимость определения видовой принадлежности пресноводных моллюсков. Противоречия между систематическими школами, существенные изменения числа видов и родов этой группы гидробионтов становятся серьезной проблемой для широкого круга специалистов.

Необычайное разнообразие формы и окраски раковины моллюсков на протяжении всего периода изучения было и остается одной из основных трудностей, возникающих при попытках провести их классификацию. Проблема влияния условий среды обитания на форму раковин отчетливо поставлена уже в работах XIX века (Жадин, 1928). Поскольку конхиологические признаки могут существенно варьировать, наряду с ними стали изучать анатомические особенности строения половой, выделительной, пищеварительной систем. Кроме того, в практику исследований вошли и другие методы: физиологические, кариологические, биохимические, иммунологические, межвидовое скрещивание в экспериментальных условиях, анализ нуклеотидных последовательностей ДНК.

Поскольку провести отчетливую грань между видовыми различиями и внутривидовыми вариациями сложно, это приводит к двум крайностям в систематике — дроблению или, напротив, к признанию небольшого числа полиморфных видов с широким ареалом, характеризующихся высоким уровнем внутривидового разнообразия. Последняя из этих двух тенденций преобладает в современных зарубежных публикациях.

Альтернативой европейскому подходу стала отечественная система классификации пресноводных моллюсков, созданная под руководством Я.И. Старобогатова. Ярослав Игоревич считал, что полиморфные виды с широким ареалом, выделяемые западными исследователями, представляют собой комплексы, состоящие из самостоятельных таксонов (Винарский, Андреева, 2007). В качестве одного из наиболее надежных классификационных признаков он предложил использовать форму фронтального сечения раковины. Выбор этого диагностического признака основан на том, что рост раковин моллюсков происходит закономерно, путем приращения подобных частей (Thompson, 1959). Для изучения моллюсков предложен компараторный метод (Логвиненко, Старобогатов, 1971), суть которого заключается в том, что формы раковин сравнивают путем сопоставления контуров фронтального (или максимально выпуклого) сечения раковин с помощью рисовального аппарата (Логвиненко, Старобогатов, 1971; Богатов, 2014).

Путем детального анализа анатомических признаков и с помощью компараторного метода пересмотрено систематическое положение многих таксонов. Самые масштабные изменения проведены на уровне видов и родов. Зарубежные исследователи считают предложенную систему излишне дробной: например, если в составе надсем. *Pisidioidea* они признают около 30 видов, то в отечественной системе их насчитывается более 200 (Корнюшин, 1996). Число таксонов пресноводных моллюсков в двух альтернативных системах существенно отличается, во многих случаях сопоставить результаты фаунистических исследований сложно или даже невозможно. Поскольку в настоящее время в систематике пресноводных моллюсков наиболее актуальны вопросы о числе видов, в предлагаемой публи-

кации считаю необходимым обратить внимание на возможные способы решения этой проблемы. Современные представления о филогенетических взаимосвязях крупных таксонов не рассмотрены, поскольку они обсуждаются в ряде зарубежных работ (Sharma et al., 2012; Gonzarlez, 2015).

#### ОБОСОБЛЕННОСТЬ И ДИВЕРГЕНЦИЯ ТАКСОНОВ

В рамках биологической концепции, в соответствии с которой сформировалась отечественная система видов пресноводных моллюсков, одной из основных характеристик вида считают его обособленность, проявляющуюся в способности сохранять свой генофонд (Maug, 1969; Старобогатов, 1985). Учитывая наличие межвидовой гибридизации, Ярослав Игоревич формулировал это понятие как “неспособность двух популяций разных видов слиться в одну за сколь угодно долгое время при отсутствии каких-либо внешних препятствий к скрещиванию” (Старобогатов, 1985). Несмотря на то, что обособленность и репродуктивная изоляция тесно связаны между собой, эти понятия не совсем совпадают. Репродуктивная изоляция может возникать в результате географической удаленности популяций или при наличии физических барьеров. В случае преодоления этих препятствий скрещивание возможно. По сути, репродуктивная изоляция — это основа для возникновения обособленности. Тогда как обособленность — это результат индивидуального развития дивергировавших групп, который проявляется в том, что у каждого из таксонов формируется свой уникальный генофонд и существуют механизмы, препятствующие их смешиванию в одно целое. Необходимо обратить внимание на то что, оценивая обособленность, мы не определяем наличие или отсутствие репродуктивной изоляции, а изучаем результаты работы изолирующих механизмов.

На практике оценка этого критерия в естественных условиях без применения генетических маркеров становится непростой задачей. Морфологический метод оценки обособленности заключается в выявлении достоверных различий по морфологическим признакам между синтопичными выборками, взятыми из одного местообитания (Старобогатов, 1968). В том случае, если признак выбран удачно, то различия по единственному признаку между двумя синтопичными выборками, по мнению Я.И. Старобогатова (1968), могут свидетельствовать о принадлежности особей к разным видам. М.В. Винарский и С.И. Андреева (2007) совершенно справедливо отметили, что в та-

ком случае исследователи не имеют оснований отвергать предположение о полиморфизме. Обособленность таких групп, по мнению указанных выше авторов, необходимо подтверждать с использованием дополнительных признаков.

Для видов, обитающих раздельно, обычно оценивают морфологический хиатус, подразумевающий наличие разрыва в ряде переходов от одной формы к другой (Старобогатов, 1968; Мауг, 1969). Такой подход не лишен проблем, связанных с отсутствием хиатуса при межвидовой гибридизации, а также вследствие полиморфизма морфологических признаков. Идентификация видовой принадлежности моллюсков с нетипичными диагностическими признаками, так же, как и выявление гибридных особей — задачи, которые могут быть решены путем применения генетических маркеров (Ворошилова и др., 2010; Ворошилова, 2015). В ходе работы иногда возникают ситуации, когда исследователи, применяющие морфологические и генетические признаки, приходят к разным выводам в отношении видовой принадлежности особей. Подобные результаты могут быть следствием следующих причин:

1. Методические ошибки в проведении генетического анализа (Абрамсон, 2009, 2013).

2. Исследуемые таксоны представляют собой ранние стадии дивергенции и не могут быть выявлены путем построения филогенетических деревьев, поскольку возможна неполная сортировка генеалогических линий митохондриальной ДНК (мтДНК) (Абрамсон, 2007, 2009).

3. Последствия межвидовой гибридизации и варьирование диагностических признаков. Крайние варианты вариационного ряда могут быть ошибочно приняты за представителей других видов (Старобогатов, 1968). Кроме того, не все морфологические признаки, традиционно применяемые для идентификации видовой принадлежности типичных особей, подходят для определения моллюсков с нетипичными признаками. В ходе исследований дрейссенид и дальневосточных жемчужниц путем сопоставления результатов определения каждой особи по морфологическим и генетическим признакам, удалось внести некоторые коррективы в диагностические ключи. Если идентификацию видовой принадлежности проводить с учетом таких уточнений, то выводы по морфологическим и генетическим признакам, в подавляющем большинстве случаев совпадают (Ворошилова, 2015; Bolotov et al., 2015).

4. Преувеличено диагностическое значение одних морфологических признаков, тогда

как недооценено значение других. Поскольку расхождения между результатами морфологического определения и генетического анализа встречается в практике исследований пресноводных моллюсков, важно сохранять или хотя бы фотографировать раковины и придерживать их единой нумерации с образцами тканей для генетического анализа.

Следует отметить, что в отличие от морфологических признаков генетический материал, используемый, в том числе для молекулярной систематики, менее подвержен влиянию внешних условий. Например, даже такое сильное воздействие, как высокий уровень радиоактивного излучения в результате Чернобыльской катастрофы, не привело к возникновению новых аллельных вариантов аллозимных локусов у полиморфной дрейссены *Dreissena polymorpha*. При сравнении участков с разным уровнем радиоактивного излучения отмечено лишь изменение частот существовавших ранее аллельных вариантов там, где был аварийный сброс горячей воды (Fetisov et al., 1992).

Новые варианты нуклеотидных последовательностей эукариот, возникают преимущественно в результате случайной ошибки репликации ДНК и рекомбинации. Особь с мутантным вариантом ДНК может оказаться нежизнеспособной и погибает. У жизнеспособных особей мутация может быть нейтральной или “вредной”, но совместимой с жизнью, или же “полезной” в определенных условиях. Согласно нейтральной теории эволюции (Kimura, 1968) подавляющее большинство мутаций селективно нейтральны и их судьба определяется стохастическими процессами. В то время как морфологические признаки обычно представляют собой результат работы нескольких генов, экспрессия которых может изменяться за счет работы регуляторных механизмов. Благодаря работе последних возможно возникновение адаптивных вариантов внешних признаков, без изменения наследственной информации. Вполне возможно, что таким образом в новых условиях происходит формирование адаптивной формы (морфотипа), которая может существенно отличаться по морфологическим признакам и быть выделена в отдельный вид. Генетические маркеры и морфологические признаки представляют собой разные функциональные части единого целого, поэтому и эволюционируют с разной скоростью. Соответственно, если результаты таксономической ревизии по морфологическим и генетическим признакам не совпадают, это не повод отрицать результаты того или иного метода,

необходимо выяснить причину таких несовпадений.

Первые наиболее масштабные популяционные исследования генофондов были выполнены с применением аллозимного электрофореза, однако в 1960–1990 гг., в период становления отечественной системы классификации пресноводных моллюсков, в России генетический анализ популяций этой группы гидробионтов проводили сравнительно редко, преимущественно для унионид (Кодолова, Логвиненко 1973, 1974). Современные молекулярно-генетические исследования, целью которых стало определение таксономического положения групп, в подавляющем большинстве случаев проводят методами кладистического анализа. Основная задача такого исследования — выделение монофилетических групп путем построения филогенетических деревьев. Следует отметить, что в рамках кладистического подхода выделение клад проводится прежде всего на основе сходства или различия признаков, маркирующих общее происхождение по принципу наиболее близкого общего предка (MRCA).

Популярность такого подхода обусловлена тем, что методология построения филогенетических деревьев хорошо обоснована статистически, сама процедура анализа ДНК алгоритмизирована. На первый взгляд, полученные выводы должны быть максимально объективными. Однако существует ряд методических проблем, которые могут существенно влиять на топологию дерева (Павлинов, 2005; Абрамсон, 2009, 2013). Если их не учитывать, в конечном итоге, даже с хорошей статистической поддержкой филогенетическое дерево может не быть истинным (Алешин, 2007).

В ходе таксономической ревизии этим методом возможны неоднозначные ситуации. Например, К. Степиен с соавторами (Stepien et al., 2013) по результатам анализа филогенетического дерева, построенного на основе данных о полиморфизме фрагмента митохондриального гена первой субъединицы цитохром оксидазы (COI) предложили выделить *D. anatolica* в отдельный вид, а *D. p. gallandi* указывать как *D. polymorpha*. Различия средних значений дивергенции между нуклеотидными последовательностями *D. p. polymorpha*, *D. p. anatolica*, *D. p. gallandi* невелики, а максимальные их значения внутри подвида *D. p. polymorpha* совпадают с минимальными между *D. p. polymorpha*–*D. p. anatolica* (таблица). Следовательно, *D. anatolica* можно рассматривать только как эволюционно молодой вид или подвид *D. p. anatolica*, но не в качестве отдельного, хорошо дифференцированного вида.

Популяционные исследования полиморфной дрейссены в широком географическом масштабе впервые проведены Мэй с соавторами (May et al., 2006; Gelembiuk et al., 2006). Анализ распределения частот и медианной сети гаплотипов этого локуса показал, что эндемичные для Турции подвиды *D. p. anatolica* (обитает в озерах Анталии) и *D. p. gallandi* (в озерах бассейна Мраморного моря) обособлены, поскольку гаплотипы турецких подвидов не обнаружены в популяциях *D. p. polymorpha*, обитающих в водных объектах Европы и Северной Америки, а варианты мтДНК, характерные для *D. p. polymorpha* не найдены у представителей турецких подвидов. Таким образом, подвид *D. p. gallandi* генетически обособлен, но при этом он не может быть выделен в качестве вида на основании разли-

чий между нуклеотидными последовательностями COI (таблица).

Второй пример — изменение таксономического статуса *D. r. bugensis*. Предполагается, что дивергенция клювовидной и бугской дрейссен (*D. r. rostriformis*, *D. r. bugensis*) происходила после вселения *D. r. rostriformis* из Каспийского в Эвксинский бассейн. В пресные воды Днепро-Бугского лимана дрейссена попала значительно позже, в результате трансгрессии, вызванной вторжением средиземноморских вод (Яковлев и др., 2012). Учитывая экологические особенности и историю формирования, одни исследователи считают ее эволюционно молодым видом *D. bugensis* (Старобогатов, 1994; Rosenberg, Ludyanskiy, 1994; Яковлев и др., 2012), тогда как другие — подвидом *D. r. bugensis* (Мордухай-Болтовской, 1960; Невеская, 1963; Бабак, 1983).

**Таблица.** Различия между нуклеотидными последовательностями *D. p. polymorpha*, *D. p. anatolica*, *D. p. gallandi* и *D. r. bugensis*, *D. r. rostriformis* по фрагменту митохондриального гена COI

Сравниваемые таксоны	Мак и min значения различий между нуклеотидными последовательностями, среднее арифметическое ± ошибка средней
<i>D. p. polymorpha</i> – <i>D. p. polymorpha</i>	0.19–1.16
<i>D. p. polymorpha</i> – <i>D. p. anatolica</i>	0.52±0.06
<i>D. p. polymorpha</i> – <i>D. p. gallandi</i>	1.16–1.35
<i>D. p. anatolica</i> – <i>D. p. polymorpha</i>	1.31±0.04
<i>D. p. polymorpha</i> – <i>D. r. bugensis</i>	0.19–0.97
<i>D. p. gallandi</i> – <i>D. r. bugensis</i>	0.70±0.06
<i>D. r. bugensis</i> – <i>D. r. bugensis</i>	0.19–0.57
<i>D. r. bugensis</i> – <i>D. r. rostriformis</i>	0.38±0.08
<i>D. r. rostriformis</i> – <i>D. r. rostriformis</i>	0.38–0.57
	0.51±0.05

Примечание. Генетические различия рассчитаны между нуклеотидными последовательностями (517 п.н.) подвидов *D. polymorpha*, номера которых указаны в публикации К. Степиен с соавторами для филогенетического анализа (Stepien et al., 2013, табл. 26.2) и фрагментами этого гена (525 п.н.) *D. r. bugensis* и *D. r. rostriformis*, номера NCBI: AF510504, AF510505–AF510507, JQ435816, DQ840133, AF479637, JX099436, U47650 (National Center ..., 2015).

Нуклеотидные последовательности митохондриальных генов COI и 16S рРНК *D. r. bugensis* отличаются от *D. r. rostriformis* менее чем на 1%. При этом значения максимальных различий между гаплотипами COI одного подвида *D. r. bugensis* совпадают с таковыми между подвидами *D. r. bugensis*–*D. r. rostriformis* (таблица). Тем не менее, ни один из вариантов 16S рРНК, характерных для вида *D. r. rostriformis*, обитающего в Каспийском море, не обнаружен в пресноводных популяциях *D. r. bugensis* (Ворошилова, 2015). Следовательно, *D. r. bugensis* и *D. r. rostriformis* генетически обособлены, однако различия между нуклеотидными последовательностями этих таксонов слишком малы для того, чтобы считать их разными видами.

Таким образом, *D. p. anatolica*, *D. p. gallandi*, *D. p. polymorpha*, *D. r. bugensis* представляют собой генетически обособленные группы, каждый из которых имеет свою эволюционную историю, становление групп проходило в совершенно разных условиях. Следует отметить, что только два из них (*D. p. polymorpha* и *D. r. bugensis*) обладают инвазионными свойствами. Очевидно, что в плане изучения направлений инвазий необходимо отличать *D. p. polymorpha* от *D. p. anatolica* и *D. p. gallandi*, а также *D. r. bugensis* от *D. r. rostriformis*.

Естественно, что не все указанные формы дрейссенид можно считать отдельными видами, поэтому применение внутривидовых категорий, основанных на разной степени генетической обособленности видов, было бы

компромиссным решением в подобных ситуациях. Наиболее подходят для этой цели маркеры митохондриальной ДНК. Несмотря на то, что моллюски представляют собой одну из немногих групп, где известно наследование мтДНК по отцовской линии и случаи рекомбинации между женским и мужским митотипами, даже у них преобладает материнское наследование без рекомбинации. Ниже рассмотрены стадии генетической обособленности, которые в основном соответствуют таксономическим категориям в рамках биологической концепции вида (Maug, 1969) и субвидовым категориям в обзоре М.В. Винарского (2015). Необходимо подчеркнуть, что под генетической обособленностью в этой публикации подразумевается наличие уникального состава вариантов нуклеотидных последовательностей ДНК, характерного для каждого из таксонов.

#### **Стадии внутривидовой обособленности**

**Морфотипы** — группа особей, изначально выделенная как вид, но ее обособленность не подтверждена генетически. В отдельных поселениях моллюсков преобладают те же варианты ДНК, что и в материнской популяции. Соответственно идентификация морфотипа возможна морфологическими или физиологическими методами. Наряду с общими гаплотипами могут присутствовать и уникальные варианты, характерные именно для этого поселения.

Необходимо подчеркнуть, что определение морфотипов часто бывает очень сложной задачей и должно выполняться преимущественно специалистами, имеющими опыт работы с определенной группой пресноводных моллюсков. Тогда как идентификация остальных категорий, рассмотренных ниже, необходима для широкого круга специалистов.

**Подвиды и эволюционно молодые виды.** Эта стадия микроэволюции характеризуется тем, что репродуктивная изоляция возникает в результате географических или иных барьеров и существует достаточно длительное время, необходимое для того, чтобы поселение моллюсков было генетически обособлено, то есть представлено вариантами нуклеотидных последовательностей ДНК, отсутствующими в популяциях исходного вида. В случае исчезновения барьеров, в зоне контакта между новой группой и особями исходного вида возможна гибридизация и интрогрессия, тем не менее, подвиды обособлены в большей части своего ареала (Майр, 1971). Отличие этой категории от предыдущей состоит в том, что подвиды

можно идентифицировать генетическими методами.

Необходимо отметить, что не все генетически обособленные группы следует считать подвидами. Частоты гаплотипов исследуемой популяции могут отличаться от донорной в том случае, если в новых условиях исходно оказалось небольшое число особей (эффект основателя), популяция прошла период катастрофического снижения численности (эффект бутылочного горлышка) или в результате дрейфа генов. Соответственно, генетическая обособленность, без учета других характеристик (морфологических, физиологических и др.), не может быть основанием для выделения подвидов или эволюционно молодых видов.

Ложные генетические различия между морфотипом и донорным видом могут быть выявлены, если внутривидовое генетическое разнообразие материнского вида изучено недостаточно (малый объем выборки при неравномерном охвате ареала). Подобные примеры рассмотрены в обзорах Н.И. Абрамсон (2007, 2009), как иллюстрация одного из “подводных камней”, которые необходимо учитывать в филогенетических исследованиях. Следует отметить, что граница между подвидом и эволюционно молодым видом условна и во многом определяется представлениями исследователя о том, что считать видом.

**Хорошо дифференцированные виды** — это стадия дивергенции, когда в зоне совместного обитания в нормальных условиях отсутствует гибридизация (или происходит редко).

**Филогенетические линии, алловиды и криптические виды** представляют собой группы, которые сложно или невозможно идентифицировать по морфологическим признакам, уровень различий между особями по генетическим маркерам сопоставим с таковыми между хорошо обособленными видами. Для выявления различий между филогенетическими линиями и криптическими видами автору этого обзора представляется наиболее целесообразным применение интегративного подхода (Integration by congruence), подразумевающего анализ разных групп признаков (Radial et al., 2010).

**Надвиды (комплексные виды)** — это стадия обособленности, когда в состав одного таксона входят несколько филогенетических линий (алловидов).

В настоящее время применение генетических методов в систематике сводится преимущественно к анализу филогенетических деревьев, построенных на основе различий

между нуклеотидными последовательностями. Как показано в обзоре Н.И. Абрамсон (2009), монографии М.В. Винарского (2013) и примерах, указанных выше, дивергенция нуклеотидных последовательностей не всегда может быть надежным критерием принадлежности к разным видам. Построение филогенетических деревьев, с моей точки зрения, представляет собой всего лишь способ предварительного анализа, позволяющий выявлять только заключительные стадии видообразования.

Для построения хорошо обоснованной классификации необходимо изучать все стадии дивергенции, оценивать не только различия между последовательностями, но и обособленность таксонов. В качестве способа диагностики последней можно применять методы филогеографии, в частности изучение распределения частот гаплотипов митохондриальной ДНК по ареалу вида. При этом традиционную схему можно дополнить анализом, заключающимся в определении наличия или отсутствия уникальных для таксона вариантов ДНК. Примечательны в этом плане работы Мэй с соавторами (May et al., 2006; Gelembiuk et al., 2006), они анализировали отдельно каждый из дробных таксонов, выделенных по морфологическим признакам. Несмотря на то, что сами авторы не оценивали обособленность, это можно сделать по их данным, которые очень наглядно представлены.

Необходимо отметить, что для изучения генетической обособленности в дополнение к секвенированию можно использовать и другие способы анализа. Идентификация отдельных позиций нуклеотидов, диагностичных для таксона, возможна с помощью более дешёвых методов, например, аллель-специфической ПЦР или рестриктного анализа. Подобный подход в качестве дополнения к другим методам, реализованным предыдущими исследователями, был применен для изучения генетической обособленности *D. r. bugensis* и *D. rostriformis* (Ворошилова, 2015).

Предполагаю, что изучение генетической обособленности таксонов поможет найти компромисс между сторонниками разных концепций вида и решить некоторые из кажущихся противоречий между результатами таксономических ревизий по морфологическим и генетическим признакам. Изучение структуры вида, подразумевающее при необходимости его подразделение на филогенетические линии, подвиды, морфотипы и их детальный анализ позволит учитывать и в дальнейшем использовать результаты предыдущих таксономических ревизий. В этом плане дробную

систему видов моллюсков, предложенную школой Я.И. Старобогатова, по сути можно считать первым шагом на пути создания новой таксономической системы моллюсков. Вторым этапом может стать сопоставление результатов детального морфологического анализа дробных видов и их генетической дивергенции, а также стадии обособленности. На основе подобного анализа видовой статус таких дробных видов может быть подтвержден или же изменен. Следующий этап – изучение распространения и систематизация морфотипов, входящих в состав вида. Вполне возможно, что практическое применение такого подхода позволит в дальнейшем избежать увеличения числа видов, и создать относительно стабильную классификацию моллюсков.

#### МАРКЕРЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Из генетических маркеров, применяемых в настоящее время, нуклеотидные последовательности мтДНК имеют более высокую скорость эволюции по сравнению с ядерными маркерами. Именно благодаря этой особенности они наиболее эффективны при изучении микроэволюции (Avice, 2004; Абрамсон, 2009; Galtier et al., 2009; Sharma et al., 2012). Основное преимущество этих маркеров заключается в том, что мтДНК передается клономально (по материнской линии), все сайты разделяют общую родословную. Следовательно, полиморфные варианты нуклеотидных последовательностей, в отличие от морфологических признаков, даже в случае межвидовой гибридизации не бывают промежуточными.

Считается, что для моллюсков характерно двойное наследование (*doubly uniparental inheritance*, DUI) митохондриальной ДНК. В гонадах самцов содержится М-тип мтДНК, который передается по мужской линии, в соматических тканях обоих полов и гонадах самок присутствует женский F-тип (Fisher, Skibinski, 1990; Hoeh et al., 1991 и мн. др.). Таким образом, у самок моллюсков преобладает обычное для эукариот материнское наследование мтДНК. Однако у самок известны и случаи нахождения М-типа в чрезвычайно малых количествах. В соматических тканях самцов преобладает F-тип, но может присутствовать и М-тип. Количество мужского типа мтДНК в соматических тканях самцов тем больше, чем ближе они расположены к гонадам (Zouros, 2013).

Различия между мужским и женским типом по фрагменту гена COI у пресноводных моллюсков достигают 34–35% (Soroka, 2008), мужской тип мтДНК эволюционирует гораздо быстрее, чем женский (Zouros, 2013). Ранее считалось, что митохондриальная ДНК не ре-

комбинирует, однако у мидий обнаружены рекомбинантные F-M гаплотипы (Ladoukakis, Zougos, 2001). Скорее всего, такие варианты ДНК крайне редки и вряд ли могут стать серьезной проблемой при анализе нуклеотидных последовательностей. Несмотря на теоретически возможную рекомбинацию и гетероплазмацию, при выделении ДНК из мышечных тканей, максимально удаленных от гонад, как правило, амплифицируется женский тип мтДНК. Случаи амплификации рекомбинантного или мужского митотипа могут быть выявлены путем секвенирования. Следует отметить, что этот способ наследования мтДНК обнаружен далеко не у всех моллюсков. Из пресноводных видов, обитающих на территории России, проблема актуальна для устриц и жемчужниц (Theologidis, 2008).

В подавляющем большинстве мутации, возникающие в митохондриальной ДНК, нейтральны, либо близки к нейтральным и накапливаются в популяциях. Следовательно, анализ митохондриальных последовательностей позволяет изучать дивергенцию таксонов (Avisé, 2004). В литературе встречаются сведения о том, что мутации мтДНК в редких случаях могут быть адаптивными (Galtier et al., 2009). Если они фиксируются в популяциях, то при небольших объемах выборок возможно ошибочное обнаружение обособленности.

Из маркеров митохондриальной ДНК чаще всего анализируют первичные последовательности фрагментов генов COI, цитохрома b (cyt b), 16S рРНК. Необходимо отметить, что для генетических маркеров так же, как и для морфологических признаков, объем изученного материала должен быть взаимосвязан с тем, насколько выражен полиморфизм по исследуемому признаку. Наиболее консервативен 16S рРНК, тогда как для cyt b характерен значительный внутривидовой полиморфизм. Следовательно, для каждого маркера оптимальный объем исследуемого материала будет разным, а при выборе более быстро эволюционирующего участка ДНК (например, cyt b и др.), необходимо увеличивать объем выборки.

Одна из основных проблем применения маркеров митохондриальной ДНК связана с наличием гибридизации в совместных поселениях моллюсков. Так как гибриды и их потомки наследуют материнский гаплотип, в популяциях могут встречаться моллюски с вариантами митохондриальной ДНК, характерной для представителей другого таксона. Для изучения гибридного происхождения обычно дополнительно используют ядерные или аллозимные маркеры. Кроме того, избежать ошибочных вы-

водов можно путем увеличения объема выборок и сбора проб в тех участках ареала, где представители каждого из предполагаемых видов обитают отдельно друг от друга.

#### МАРКЕРЫ ЯДЕРНОЙ ДНК

Из нуклеотидных последовательностей ядерной ДНК в настоящее время наиболее часто используют многокопийные рибосомные гены (18S и 28S рРНК) и межгенные спейсеры (ITS1, ITS2), которые имеют разные темпы эволюции, возможно их применение для изучения разных уровней филогении. Считается, что они эволюционируют согласованно (Hillis, Davis, 1988), и в ходе эволюции происходит гомогенизация последовательностей (Dover, 1994). Соответственно, в некоторых случаях возможно прочтение консенсусных последовательностей многокопийных участков ДНК без молекулярного клонирования. К сожалению, применение этих маркеров имеет свои ограничения.

Первая проблема связана с тем, что у отдельных групп моллюсков в участках ДНК с высоким содержанием гуанина и цитозина внутримолекулярные взаимодействия способствуют амплификации химерных последовательностей и возникают проблемы с получением нужного продукта ПЦР (полимеразная цепная реакция). Считается, что в таких случаях возрастает вероятность загрязнения исследуемого фрагмента продуктами амплификации кормовых объектов и паразитов, поскольку стандартные праймеры для синтеза 18S рРНК сконструированы для консервативных участков ДНК (Meyer et al., 2010). Ген 18S рРНК эволюционирует медленнее, чем 28S рРНК и межгенные спейсеры, поэтому проблема полиморфизма менее актуальна, чем при использовании других последовательностей рибосомного кластера. Маркер может быть достаточно эффективным для того, чтобы различать хорошо дивергировавшие виды (Bargues, Mas-Coma, 1997; Bargues et al., 1997; Bolotov et al., 2015), но не во всех случаях подходит для определения таксономической принадлежности близкородственных видов (Bargues, Mas-Coma, 2005).

Вторая проблема применения ядерных маркеров — существование полиморфных вариантов нуклеотидных последовательностей, возникающих в результате рекомбинации. В случае межвидовой гибридизации и последующих рекомбинациях сложно предсказать направления гомогенизации нуклеотидных последовательностей (Feliner, Rossely, 2007). Например, для *D. polymorpha* описано два варианта 28S рРНК, обозначенные как типы А (NCBI: AF131006) и В (NCBI: AF131007). *D. polymorpha* (тип А) образует единый кла-

стер с представителем другого подрода *D. r. bugensis* (Park, Ó Foighil, 2000). Внутривидовые различия между последовательностями достигают 8%, тогда как межвидовые (*D. polymorpha* и *D. r. bugensis*) — 3% (NCBI: AF131006, AF131008). Авторы указанной выше работы объясняют такой результат наличием сетчатой эволюции. Хотя эта проблема не стала причиной каких-либо изменений в систематике дрейссенид, тем не менее, при проведении исследований необходимо учитывать существование подобных вариантов нуклеотидных последовательностей.

Поскольку межгенные спейсеры ITS не являются кодирующими, они эволюционируют значительно быстрее по сравнению с генами рибосомного кластера и считаются маркерами, более подходящими для изучения дивергенции близких видов (Bargues, Mas-Coma, 2005 и мн. др.). Тем не менее, можно предположить, что темпы эволюции межгенного спейсера могут существенно различаться у разных систематических групп. Например, у представителей надсемейства Pisidioidea этот участок ДНК консервативен (Lee, Ó Foighil, 2003).

Особенность этого маркера в том, что амплифицированные фрагменты разных видов различаются не только по последовательностям нуклеотидов, но и по длине продуктов ПЦР. Это очень удобно для определения видовой принадлежности особей и идентификации межвидовых гибридов по длине продуктов амплификации (Aguilar et al., 1999; Rauscher et al., 2002 и мн. др.), но может стать серьезной проблемой в ходе построения филогенетических деревьев. Существенные различия по длине продукта амплификации отмечены у разных таксонов: максимальные межвидовые различия у прудовиков достигают 121 п.н. (370–491 п.н.) (Bargues, Mas-Coma, 2005), а у ITS1 сфериид — 178 п.н. (504–682 п.н.) (Lee, Ó Foighil, 2003). При таких различиях по длине провести выравнивание очень проблематично, следовательно, а ошибки в выравнивании неизбежно приведут к ложной топологии филогенетического дерева, полученного на его основе.

Для растений и некоторых групп водных беспозвоночных проводят сравнение вторичной структуры этого участка ДНК (Grajales et al., 2007; Keller et al., 2008), но этот подход пока не популярен в филогенетических исследованиях моллюсков. Более рациональным решением в такой ситуации, с моей точки зрения, будет использование только одного из двух межгенных спейсеров (ITS1 или ITS2), не столь сильно варьирующего по длине, или другого маркера. Тем более что в последние

годы их выбор значительно увеличился благодаря внедрению в практику филогенетических исследований для беспозвоночных протеин-кодирующих локусов (Audzijonyte, Vrijenhoek, 2010; Sharma et al., 2012).

Известны случаи внутрииндивидуального полиморфизма по этому маркеру (Insua, 2003; Armbuster, Korte, 2006). Например, 12 особей жемчужницы *Cumberlandia monodonta* (Say, 1828) из р. Клинч (США) содержат 57 вариантов нуклеотидных последовательностей ITS. Максимальные различия между внутривидовыми вариантами составляют 8%. Обсуждая полученные результаты, автор работы (Elderkin, 2009) делает заключение о том, что маркер необходимо осторожно применять в филогенетических исследованиях.

В тех случаях, когда различия по длине сравниваемых участков ДНК не столь велики, и в ходе согласованной эволюции произошла гомогенизация, то первичные последовательности межгенных спейсеров могут быть неплохими маркерами для сравнения близкородственных видов. Тем не менее, при наличии внутривидового полиморфизма в географически удаленных популяциях могут фиксироваться разные внутривидовые варианты (Dover, 1982; Elder, Turner, 1995), сравнение которых при малых выборках может привести к ошибочным выводам.

Несмотря на указанные выше недостатки, последовательности рибосомного кластера пока остаются основными ядерными маркерами, необходимыми как дополнение к митохондриальным при рассмотрении соответствий между дробными отечественными и комплексными зарубежными видами, а также идентификация гибридного происхождения особей. Вполне возможно, что среди малокопийных ядерных генов будут найдены более надежные маркеры для этих целей (Feliner, Rossely, 2007; Audzijonyte, Vrijenhoek, 2010; Sharma et al., 2012).

Конечно, в плане понимания механизмов формирования обособленности видов важны исследования генов, отвечающих за формирование репродуктивной изоляции (Wu, Ting, 2004). Однако маловероятно, что подобные гены будут лучшими филогенетическими маркерами, поскольку репродуктивная изоляция может быть связана не с одним геном. Кроме того, вполне возможно, что ее возникновение происходит не только благодаря их дивергенции, но и в результате изменения работы регуляторных механизмов. Например, даже внутривидовое скрещивание в экспериментальных условиях без дополнительной стимуляции

возможно не для всех видов. А в результате искусственной стимуляции получают гибриды таких видов моллюсков и рыб, которые в естественных условиях обособлены (Nichols, Black, 1994; Артамонова, Махров, 2015).

Секвенирование РНК так же, как и полногеномный анализ с точки зрения некоторых исследователей могут быть полезны для целей таксономии (Gonzales et al., 2015). Однако вследствие высокой стоимости подобных работ, в ближайшее время эти методы вряд ли найдут широкое применение для изучения низших уровней иерархии в классификации пресноводных моллюсков.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая, что организм представляет собой единое целое, эволюция всех признаков связана между собой. Соответственно, противоречия между результатами применения морфологических, физиологических, генетических и других методов, а также и классификационных подходов — это всего лишь следствие наших ограниченных знаний о закономерностях эволюции. Поэтому создать стабильную и удобную для практического применения систему можно только в результате изучения всех стадий видообразования, а также совместного применения разных методов анализа. Естественно, что подобные исследования потребуют значительных затрат времени, сил и финансирования.

Если для исследуемой группы актуальны проблемы, сходные с теми, которые в настоящее время присутствуют в систематике пресноводных моллюсков, то выбор быстрого способа изучения биоразнообразия, таких как, например, турбо-таксономии (turbo-taxonomy), хотя и имеет положительную сторону (быстрое пополнение баз данных), неминуемо приведет к тупику. Сторонники турбо-таксономии предлагают провести быструю

инвентаризацию фауны. Вся информация публикуется в журналах с открытым доступом, а фотографии и нуклеотидные последовательности образцов, определенных специалистами, депонируют в общедоступные базы данных. Время при таком подходе экономят за счет упрощения диагностических ключей по морфологическим признакам, поскольку определение видовой принадлежности образцов основано преимущественно на ДНК-штрихкодировании (Riedel et al., 2013).

В ходе применения такого подхода для изучения разнообразия моллюсков могут возникнуть следующие проблемы. 1. Сложности, обусловленные наличием разных таксономических подходов в систематике исследуемой группы. Например, нуклеотидные последовательности известны только для крупных полиморфных видов. Дробные таксоны, которые рассматривают в составе таких видов, могут отличаться друг от друга генетически. 2. Причиной ошибочной идентификации видовой принадлежности особей могут быть недостаточные сведения о морфологическом и генетическом полиморфизме в разных частях ареалов видов. Необходимо подчеркнуть, что без учета генетического полиморфизма и межвидовой гибридизации, даже при идентификации видовой принадлежности ДНК-штрихкодированием возможны серьезные проблемы. Отказ от анализа морфологического и генетического полиморфизма может привести как к описанию несуществующих в реальности новых видов, так и наоборот, к неоправданному их объединению. Таким образом, быстрые методы анализа биоразнообразия (ДНК-штрихкодирование, турбо-таксономия) эффективны в тех случаях, когда при построении классификации учтены особенности микроэволюции исследуемой группы.

**Благодарности.** Автор искренне признателен анонимному рецензенту, Е.А. Боровиковой, А.А. Фролову за ценные замечания и рекомендации по тексту рукописи, а также А.А. Махрову, В.С. Артамоновой за обсуждение некоторых вопросов, рассмотренных в этой публикации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вестник ВОГиС. 2007. Vol. 11. № 2. P. 307–331. Abramson N.I. Filogeografiya: itogi, problemy, perspektivy // Vestnik VOGiS. 2007. Vol. 11. № 2. P. 307–331 [Abramson N.I. Phylogeography: results, issues and perspectives. Vavilov J. of Genetics and Breeding. 2007. Vol. 11. № 2. P. 307–331.] In Russian
- Абрамсон Н.И. Молекулярные маркеры, филогеография и поиск критерия разграничения видов // Тр. Зоол. ин-та РАН. 2009. Прил. № 1. С. 185–198. Abramson N.I. Molekulyarnye markery, filogeografiya i poisk kriteriya razgranicheniya vidov // Tr. Zool. in-ta RAN 2009. Pril. № 1. С. 185–198 [Abramson N.I. Molecular markers, phylogeography and search for the criteria for delimiting species// Proc. Zool. Inst., Rus. Acad. Sci. 2009. Suppl. № 1. С. 185–198.] In Russian
- Абрамсон Н.И. Молекулярная и традиционная филогенетика. На пути к взаимопониманию // Тр. Зоол. института РАН ин-та. 2013. Прил. № 2. С. 219–229. Abramson N.I. Molekulyarnaya i traditsionnaya filogenetika. Na puti k vzaimoponimaniyu // Tr. Zool. instituta RAN in-ta. 2013. Pril. № 2. S. 219–229. [Abramson N.I. Molecular and

- conventional phylogenetic. Towards the common ground // Proc. Zool. Inst., Rus. Acad. Sci. 2013. Suppl. № 2. P. 219–229.] In Russian
- Алешин В.В., Константинова А.В., Михайлов К.В., et al. Нужно ли много генов для филогенетического дерева? // Биохимия. 2007. Т. 72. № 12. С. 1610–1623. (Aleshin V.V., Konstantinova A.V., Mikhailov K.V., Nikitin M.A., Petrov N.B. Do we need many genes for phylogenetic inference? // Biochemistry (Mosc). 2007. Vol. 72. № 12. P. 1313–1323)
- Артамонова В.С., Махров А.А. Генетические методы в лососеводстве и форелеводстве: от традиционной селекции до нанобиотехнологий. М.: КМК. 2015. 128 с. Artamonova V.S., Makhrov A.A. Geneticheskie metody v lososevodstve i forelevodstve: ot traditsionnoy seleksii do nanobiotekhnologiy. M.: KMK. 2015. 128 s. [Artamonova V.S., Makhrov A.A. Genetic Methods in Salmon and Trout Breeding: From Traditional Selection to Nanobiotechnologies. M.: KMK Scientific Press. 2015. 128 p.] In Russian
- Бабак Е. В. Плиоценовые и четвертичные дрейссениды Эвксинского бассейна // Тр. Палеонтол. ин-та АН СССР. 1983. Т. 204. 104 с. Babak E. V. Pliotsenovyie i chetvertichnye dreyszenidy Evksinskogo basseyna // Tr. Paleontol. in-ta AN SSSR. 1983. T. 204. 104 s. [Babak E.V. The Pliocene and Quaternary Dreissenidae of the Evsinsk Basin // Tr. Paleontol. Institute AN SSSR. 1983. Vol. 204. 104 p.] In Russian
- Богатов В. В. Есть ли будущее у компараторного метода при диагностике крупных двустворчатых моллюсков? (Bivalvia: Unionida) // Изв. РАН Сер. Биол. 2014. №3. с. 309–320. (Bogatov V.V. Does the comparator method have a future in diagnosing large bivalves (Bivalvia: Unionida)? // Biol. Bull. 2014. № 3. P. 309–320. DOI:10.7868/S0002332914030035)
- Винарский М.В., Андреева С.И. К вопросу о виде у пресноводных моллюсков: история и современность // Теоретические и практические проблемы изучения сообществ беспозвоночных: памяти Я.И. Старобогатова. Москва: КМК, 2007. С.130–147. Vinarskiy M.V., Andreeva S.I. K voprosu o vide u presnovodnykh mollyuskov: istoriya i sovremennost' // Teoreticheskie i prakticheskie problemy izucheniya soobshchestv bespozvonochnykh: pamyati Ya.I. Starobogatova. Moskva: KMK, 2007. S.130–147. [Vinarski M.V., Andreeva S.I. On the species question in freshwater molluscs: a historical prospect and recent state // Theoretical and practical problems of studying of invertebrates associations: In memory Ya.I. Starobogatov. Moscow: KMK, 2007. P. 130–147] In Russian
- Винарский М.В. Изменчивость пресноводных легочных моллюсков (таксономический аспект). Омск: ОмГПУ, 2013. 268 с. Vinarskiy M.V. Izmenchivost' presnovodnykh legochnykh mollyuskov (taksonomicheskii aspekt). Omsk: OmGPU, 2013. 268 s. [Vinarski M.V. Variability in freshwater Pulmonate mollusks (a taxonomic perspective) Omsk: OmSPU Press, 2013. 268 p.] In Russian
- Винарский М. В. Судьба категории подвида в зоологической систематике. 2. Современность // Журн. Общ. Биол. 2015. Т. 76. № 2. С. 99–110. (Vinarski M. V. The fate of subspecies category in zoological systematics. 2. The present // J. General Biol. 2015. Vol. 76. № 2. P. 99–110. DOI: 10.1134/S2079086415050060)
- Ворошилова И.С., Артамонова В.С., Махров А.А., et al. Гибридизация двух видов дрейссен *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) and *Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897) в естественных условиях // Изв. РАН Сер. Биол. 2010. №5, С. 631–636. (Voroshilova I. S., Artamonova V. S., Makhrov A. A., Slyn'ko Yu. V. Natural Hybridization of Two Mussel Species *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) and *Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897) // Biol. Bull. 2010. Vol. 37. № 5. P. 542–547. DOI: 10.1134/S1062359010050158)
- Ворошилова И.С. Морфологическая и генетическая идентификация пресноводных дрейссен: *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), *D. rostriformis bugensis* Andrusov, 1897 (Dreissenidae, Bivalvia) // Рос. Журн. Биол. Инвазий. 2015. № 4. С. 42–51. (Voroshilova I. S. Morphological and genetic identification of freshwater dreissenid mussels: *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), *D. rostriformis bugensis* Andrusov, 1897 (Bivalvia) // Rus. J. Biol. Invas. 2016. № 1. (in press))
- Жадин В.И. Исследования по экологии и изменчивости *Vivipara fasciata* Müll. Саратов: Главнаука, 1928. 94 с. Zhadin V.I. Issledovaniya po ekologii i izmenchivosti *Vivipara fasciata* Müll. Saratov: Glavnauka, 1928. 94 s. [Zhadin V.I. Researches of ecology and variability of *Vivipara fasciata* Müll. Saratov: Glavnauka, 1928. 94 p.] In Russian
- Кодолова О.П., Логвиненко Б.М. Сравнение разных популяций двустворчатых моллюсков *Unio pictorum* L. и *U. tumidus* Retz. (Unionidae) по системам миогенов и морфологии раковины // Зоол. журн. 1973. Т. 52. № 7. С. 987–988. Kodolova O.P., Logvinenko B.M. Sravnenie raznykh populyatsiy dvustvorchatykh mollyuskov *Unio pictorum* L. i *U. tumidus* Retz. (Unionidae) po sistemam miogenov i morfologii rakoviny // Zool. zhurn. 1973. T. 52. № 7. S. 987–988 [Kodolova O.P., Logvinenko B.M. Comparison of different populations of bivalves *Unio pictorum* L. and *U. tumidus* Retz. (Unionidae) by miogenic systems and shell morphology // Zool. J. 1973. Vol. 52. № 7. P. 987–988.] In Russian
- Кодолова О.П., Логвиненко Б.М. Сравнение разных популяций двустворчатых моллюсков рода Anodonta (Unionidae) по системам миогенов и морфологии раковины // Зоол. журн. 1974. Т. 53. № 4. С. 531–545. Kodolova O.P., Logvinenko B.M. Sravnenie raznykh populyatsiy dvustvorchatykh mollyuskov roda Anodonta (Unionidae) po sistemam miogenov i morfologii rakoviny // Zool. zhurn. 1974. T. 53. № 4. S. 531–545. [Kodolova O.P., Logvinenko B.M. Comparison of different populations of bivalves from genus Anodonta (Unionidae) by myogenic systems and shell morphology // Zool. J. 1974. Vol. 53. № 4. P. 531–545.] In Russian
- Корнюшин А.В. Двустворчатые моллюски надсемейства Pisidioidea Палеарктики (фауна, систематика, филогения). Киев, 1996. 175 с. Kornyushin A.V. Dvustvorchatye mollyuski nadsemeystva Pisidioidea Palearktiki (fauna, systematika, filogeniya). Kiev, 1996. 175 s.

- sistematika, filogeniya). Kiev, 1996. 175 s. [Korniushin A.V. Bivalve molluscs of the superfamily Pisidioidea in the Palaearctic region (Fauna, systematics, phylogeny). Kiev, 1996. 175 p.] In Russian
- Логвиненко Б. М., Старобогатов Я. И. Кривизна фронтального сечения створки как систематический признак у двустворчатых моллюсков // Науч. докл. высш. шк. Биол. науки. 1971. № 5. С. 7–11. Logvinenko B. M., Starobogatov Ya. I. Krivizna frontal'nogo secheniya stvorki kak sistematicheskiy priznak u dvustvorchatykh mollyuskov // Nauch. dokl. vyssh. shk. Biol. nauki. 1971. № 5. S. 7–11. [Logvinenko B. M., Starobogatov Ya. I. Curvature of frontal section of the valve as taxonomical character in bivalve molluscs // Nauch. dokl. vyssh. shk. biol. Nauki 1971. № 5. P. 7–11.] In Russian
- Мордухай-Болтовской Ф. Д. Каспийская фауна в Азово-Черноморском бассейне. М.; Л.: АН СССР, 1960. 287 с. Mordukhay-Boltovskoy F. D. Kaspiyskaya fauna v Azovo-Chernomorskom basseyne. M.; L.: AN SSSR, 1960. 286 s. [Mordukhay-Boltovskoy F. D. Caspian fauna in Azov and Black Sea basin. M.; L.: AN SSSR, 1960. 287 p.] In Russian
- Невесская Л. А. Позднечетвертичные двустворчатые моллюски Черного моря, их систематика и экология // Тр. Палеонтол. ин-та АН СССР. 1965. Т. 105. 390 с. Nevesskaya L. A. Pozdnechetvertichnye dvustvorchatye mollyuski Chernogo morya, ikh sistematika i ekologiya // Tr. Paleontol. in-ta AN SSSR. 1965. T. 105. 390 s. [Nevesskaya L.A. Late Quaternary bivalve mollusks of the Black Sea, their systematics and ecology. Tr. Paleontol. Inst. AN SSSR. 1965. Vol. 105. 390 p.] In Russian
- Павлинов И.Я. Введение в современную филогенетику (кладогенетический аспект). Москва: КМК, 2005. 391 с. Pavlinov I.Ya. Vvedenie v sovremennuyu filogenetiku (kladogeneticheskiy aspekt). M.: KMK, 2005. 391 s. [Pavlinov I. Ya. Introduction to contemporary phylogenetics (a cladogenetic aspect). M.: KMK, 2005. 391 p.] In Russian
- Старобогатов Я.И. Проблема видообразования // Итоги Науки и техники. Серия "Общая геология". 1985. Т. 20. 94 с. Starobogatov Ya.I. Problema vidoobrazovaniya // Itogi Nauki i tekhniki. Seriya "Obshchaya geologiya". 1985. T. 20. 94 s. [Starobogatov Ya.I. The problem of speciation // Summary of Science and technology. A ser. "General Geology". 1985. Vol. 20. 94 p.] In Russian
- Старобогатов Я.И. Практические приемы систематики и вопрос о критерии вида // Зоол. Журн. Т. 47. № 6. С. 875–886. Starobogatov Ya.I. Prakticheskie priemy sistematiki i vopros o kriterii vida // Zool. Zhurn. T. 47. Vyp. 6. S. 875–886. [Starobogatov Ya. I. Practical methods of systematics and the problem of the species criteria // Rus. J. Zool. Vol. 47. №. 6. P. 875–886.] In Russian
- Старобогатов Я.И. Систематика и палеонтология // В кн.: Дрейссена: Систематика, экология, практическое значение. М.: Наука, 1994. С. 18–46. Starobogatov Ya.I. Sistematika i paleontologiya // V kn.: Dreysena: Sistematika, ekologiya, prakticheskoe znachenie. M.: Nauka, 1994. S. 18–46. [Starobogatov Ya.I. Taxonomy and paleontology. In: Freshwater Zebra Mussel: *Dreissena polymorpha* (Pall.) (Bivalvia, Dreissenidae): Systematics, Ecology, Practical Meaning (ed. Starobogatov YI). M.: Nauka, 1994. P. 18–46.] In Russian
- Яковлев В.Н., Ворошилова И.С., Павлова В.В. Инвазии дрейссенид (*D. bugensis* и *D. polymorpha*): эволюционный аспект // Бассейн Волги в XXI веке: структура и функционирование экосистем водохранилищ. Матер. Всерос. конф. Борок, 22–26 октября, 2016. Ижевск: Издатель Пермьяков С. А., 2012. С. 371–374. Yakovlev V.N., Voroshilova I.S., Pavlova V.V. Invazii dreyssehid (*D. bugensis* i *D. polymorpha*): evolyutsionnyy aspekt // Basseyn Volgi v XXI veke: struktura i funktsionirovanie ekosistem vodokhranilishch. Mater. Vseros. konf. Borok, 22–26 oktyabrya, 2016. Izhevsk: Izdatel' Permyakov S. A., 2012. S. 371–374. [Yakovlev V. N., Voroshilova I. S., Pavlova, V. V. Invasions of dreissenids (*D. bugensis* and *D. polymorpha*): an evolutionary aspect // Proc. Rus. Conf. The Volga River basin in the XXI century: the structure and functioning of reservoir ecosystems. Borok. 22–26 October, 2012. Izhevsk: Permyakov S. A., 2012. S. 371–374] In Russian
- Aguilar J.F., Rossello J.A., Feliner G.N. Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae) // Mol. Ecol. 1999. V. 8. P. 1341–1346. DOI: 10.1046/j.1365-294X.1999.00690.x
- Armbruster G.F.J., Korte A. Genomic nucleotide variation in the ITS1 rDNA spacer of land snails // J. Moll. Stud. 2006. Vol. 72. P. 211–219. DOI: 10.1093/mollus/eyi056
- Audzijonyte A., Vrijenhoek R. C. Three nuclear genes for phylogenetic, SNP and population genetic studies of molluscs and other invertebrates // Mol. Ecol. Res. 2010. Vol. 10. P. 200–204. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02737.x
- Avise J. C. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Second Ed. Sunderland: Massachusetts Sinauer Associates, Ins. Publ., 2004. 684 p.
- Bargues M.D., Mas-Coma S. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences // Mol. Biol. Evol. 1997. Vol. 14. P. 569–577.
- Bargues M.D., Mangold A.J., Munoz-Antoli C., et al. SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America // J. Parasitol. 1997. Vol. 83. P. 1086–1092.
- Bargues M.D., Mas-Coma S. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses // J. Helminthol. 2005. Vol. 79. P. 257–267. DOI: 10.1079/JOH2005297
- Bolotov I.N., Bespalaya Y.V., Vikhrev I.V., et al. Taxonomy and Distribution of Freshwater Pearl Mussels (Unionoida: Margaritiferidae) of the Russian Far East // PLoS ONE. 2015. Vol. 10. № 5. e0122408. DOI: 10.1371/journal.pone.0122408
- David D.C., Savini D. Molecular approaches to bivalve populations studies: a review // Analele tiinifice ale Universitii „Alexandru Ioan Cuza”, Seciunea Genetic i Biologie Molecular, Vol. XII. 2011. P. 1–13.

- Dover G.A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution // *Nature*. 1982. Vol. 299. P. 111–116. DOI:10.1038/299111a0
- Elderkin C.L. Intragenomic variation in the rDNA internal transcribed spacer (ITS1) in the freshwater mussel *Cumberlandia monodonta* (Say, 1828) // *J. Moll. Stud.* 2009. Vol. 75. P. 419–421. DOI: 10.1093/mollus/eyp043
- Elder J.F., Turner B.J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes // *Quarterly Rev. of Biol.* 1995. Vol. 70. P. 297–320.
- Feliner G.N., Rossely J.A. Better the devil to know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA *ITS* in species-level evolutionary studies in plants // *Mol. Phyl. Evol.* 2007. Vol. 44. № 2. P. 911–919. DOI:10.1016/j.ympev.2007.01.013
- Fetisov A.N., Rubanovich A.V., Slipchenko T.S., et al. The structure of *Dreissena polymorpha* populations from basins adjacent to the Chernobyl atomic power station // *The Science of the Total Environment*. 1992. Vol. 112. P. 115–124.
- Fisher C., Skibinski D. O. F. Sex-biased mitochondrial heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus* // *Proc. R. Soc., B.* 1990. Vol. 242. P. 149–156. DOI: 10.1098/rspb.1990.0118
- Galtier N., Nabholz, B., Glemin S., et al. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal // *Mol. Ecol.* 2009. Vol. 18. P. 4541–4550 DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x
- Gelembiuk G.W., May G.E., Lee C.E. Phylogeography and systematics of zebra mussels and related species // *Molecular Ecology*. 2006. Vol. 15. P. 1033–1050. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02816.x
- Gonzarlez V.L., Andrade S.C.S, Bieler R., et al. Phylogenetic backbone for Bivalvia: an RNA-seq approach // *Proc. R. Soc. B.* 2015. Vol. 282. P. 1–6. DOI: 10.1098/rspb.2014.2332
- Grajales A., Aguilar C., Sánchez J.A. Phylogenetic reconstruction using secondary structures of Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA): finding the molecular and morphological gap in Caribbean gorgonian corals // *BMC Evol. Biol.* 2007. Vol. 7 № 90. P. 1–9. DOI:10.1186/1471-2148-7-90
- Hillis D.M., Davis S.K. Ribosomal DNA: Intraspecific Holymorphism, Conserted Evolution, and Phylogeny Reconstruction // *Syst. Zool.* 1988. Vol. 37. P. 63–66. DOI: 10.2307/2413191
- Hoeh W.R., Blakey K.H., Brown W.M. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance in *Mytilus* mitochondrial DNA // *Science*. 1991. Vol. 251. P. 1488–1490. DOI: 10.1126/science.1672472
- Insua A., Lopezpinon M. J., Freire R. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae) // *Genome*. 2003. Vol. 46. P. 595–604. DOI: 10.1139/g03-045
- Keller A., Schleicher T., Forster F. et al. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (*Sphaeropleales*) // *BMC Evol. Biol.* 2008. Vol. 8. № 218. P. 1–12. DOI: 10.1186/1471-2148-8-218
- Kimura M. Evolutionary Rate at the Molecular Level // *Nature* 1968. Vol. 217. P. 624–626. DOI:10.1038/217624a0
- Ladoukakis E. D., Zouros E. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA // *Mol. Biol. Evol.* 2001. Vol. 18. P. 1168–1175.
- Lee T., Ó Foighil D. Phylogenetic structure of the Sphaeriinae, a global clade of freshwater bivalve molluscs, inferred from nuclear (ITS-1) and mitochondrial (16S) ribosomal gene sequences // *Zool. J. Linn. Soc.* 2003. Vol. 137. P. 245–260.
- May G.E., Gelembiuk G.W., Panov V.E., et al. Molecular ecology of zebra mussel invasions // *Molecular Ecology*. 2006. Vol. 15. P. 1021–1031. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02814.x
- Mayer E. Principles of Systematic Zoologi New York: McGraw-Hill, 1969. 428 p.
- Meyer A., Todt C., Mikkelsen N. T., et al. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity // *BMC Evolutionary Biology*. 2010. Vol. 10. № 70. DOI:10.1186/1471-2148-10-70
- National Center for Biotechnology Information (Электронный ресурс) // <http://ncbi.nlm.nih.gov>.
- Nichols S.J., Black M.G. Identification of larvae: The zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) and Asian clam (*Corbicula fluminea*) // *Can. J. Zool.* 1994. Vol. 72. № 3. P. 406–417.
- Padial J.M., Miralles A., De la Riva I., et al. The integrative future of taxonomy // *Frontiers in Zoology*. 2010. Vol. 7. № 16. P. 1–14. DOI: 10.1186/1742-9994-7-16
- Park J.K., O' Foighil D. Sphaeriid and corbiculid clams represent separate heterodont bivalve radiations into freshwater environments // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2000. Vol. 14. № 1. P. 75–88.
- Rauscher J.T., Doyle J. J., Brown A.H.D. Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex // *Mol. Ecol.* 2002. Vol. 11. P. 2691–2702. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01640.x
- Riedel A., Sagata K., Suhardjono Y.R. et al. Integrative taxonomy on the fast track - towards more sustainability in biodiversity research // *Frontiers in Zoology*. 2013. Vol. 10. № 15. DOI: 10.1186/1742-9994-10-15
- Rosenberg G., Ludysanskiy M.L. A nomenclatural review of *Dreissena* (Bivalvia: Dreissenidae), with identification of the quagga mussel as *Dreissena bugensis* // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1994. Vol. 51. P. 1474–1484. DOI: 10.1139/f94-147
- Soroka M. Doubly Uniparental Inheritance of Mitochondrial DNA in the Freshwater Bivalve *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionidae) // *Folia biologica*. 2008. Vol. 56. № 1–2. P. 91–95. DOI: 10.3409/fb56\_1-2.91-95
- Stepien C.A., Grigorovich I.A., Gray M.A. et al. Evolutionary, Biogeographic, and Population Genetic Relationships of Dreissenid Mussels, with Revision of Component Taxa. Ch. 26 // *Quagga and zebra mussels: biology, impacts, and control* /eds. T. F. Nalepa, D. W. Schloesser. London, New York: CRC Press, 2013. P. 403–444.

- Sharma P.P., González V.L., Kawauchi G.Y. et al. Phylogenetic analysis of four nuclear protein-encoding genes largely corroborates the traditional classification of Bivalvia (Mollusca) // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2012. Vol. 65. P. 64–74. DOI: 10.1016/j.ympev.2012.05.025
- Theologidis I., Fodelianakis S., Gaspar M.B. et al. Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia // *Evol. Int. J. Org. Evol.* 2008. Vol. 62. P. 959–970. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00329.x>
- Thompson A.W. *Groth and Form*. Cambridge; New York: Univ. Press, 1946. 1116 p.
- Wu Ch.-I., Ting Ch.-T. Genes and speciation // *Nature Rev Gen.* 2004. Vol. 5. P. 114–122. DOI:10.1038/nrg1269
- Zouros E. Biparental Inheritance Through Uniparental Transmission: The Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of Mitochondrial DNA // *Evolutionary Biology*. 2013. Vol. 40. № 1. P. 1–31 DOI: 10.1007/s11692-012-9195-2

## **PROBLEMS AND PROSPECTS OF MOLECULAR-GENETIC METHODS APPLICATION FOR TAXONOMIC REVISION OF FRESHWATER MOLLUSKS**

**I. S. Voroshilova**

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

At present there are two opposing trends in taxonomy — splitting and combining of the taxa. Currently the first of these trends dominates in the Russian systematics of freshwater mollusks, while the second trend prevails in investigations of foreign authors. The problems and prospects of molecular-genetic methods application for taxonomic revision of freshwater mollusks are discussed in this review.

*Key words:* freshwater mollusks, DNA, systematics.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОРОД РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*PARASALMO MYKISS*), РАЗВОДИМЫХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**В. С. Артамонова<sup>1</sup>, В. А. Янковская<sup>2</sup>, В. М. Голод<sup>3</sup>, А. А. Махров<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,  
119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33; e-mail: valar99@mail.ru

<sup>2</sup>ООО “Мерке”,

143980, Московская обл., г. Железнодорожный, ул. Советская, д. 46; e-mail: [v.yankovskaya@gmail.com](mailto:v.yankovskaya@gmail.com)

<sup>3</sup>ФГБУ Федеральный селекционно-генетический центр рыбоводства,

188514, пос. Ропша Ленинградской области, Стрельнинское шоссе, д. 4; e-mail: [ropshatrout@yandex.ru](mailto:ropshatrout@yandex.ru)

<sup>4</sup>ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,  
119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33; e-mail: [makhrov12@mail.ru](mailto:makhrov12@mail.ru)

В работе изучено генетическое разнообразие всех пород радужной форели, зарегистрированных в Государственном реестре селекционных достижений РФ (форель Дональдсона, форель Камлоопс, лосось стальноголовой, “Ропфор”, “Росталь”, “Адлер” и “Адлерская янтарная”) по шести микросателлитным локусам (*Ssa197*, *Ssa408*, *Omy1001*, *Omy1300*, *Omy1212* и *One111*). Гетерогенность частот аллелей всех изученных локусов между породами была высоко значима ( $p < 0.001$ ). Несмотря на то, что большинство аллелей микросателлитных локусов являются общими для всех пород радужной форели, в генофонде практически каждой из них имеются аллели, характерные только для этой породы или для группы пород. Полученные данные могут быть использованы для решения практических задач: определения принадлежности конкретной рыбы к той или иной породе, мониторинга генетического разнообразия, выявления триплоидов. Кроме того, генетическая дифференциация пород радужной форели отражает особенности начальных этапов эволюционного процесса, происходящего в ходе формирования новой популяции, а потому сведения такого рода могут быть полезны при построении эволюционных моделей.

**Ключевые слова:** микросателлиты, генетическая паспортизация, чужеродные виды, микроэволюция, доместикация, радужная форель, микижа, породы.

### ВВЕДЕНИЕ

Радужная форель — основной объект форелеводства. В 2012 г. в мире, по данным ФАО (<ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-6.pdf>), было выращено 878 702 тонн радужной форели, а в России в этом же году — 25 000 т (Захаров, 2013). В связи с этим, изучение генофонда пород радужной форели имеет важное практическое значение. Ведь наблюдаемое генетическое разнообразие — это, с одной стороны, результат работы селекционеров, а с другой — резерв для дальнейшей селекционной работы, которая, несомненно, будет востребована в связи с тем, что форелеводство развивается, в том числе, и в тех районах, для которых существующие породы радужной форели адаптированы не были.

Целью настоящей работы было изучение генетического разнообразия по микросателлитным локусам всех пород радужной форели, зарегистрированных в Государственном реестре селекционных достижений Российской Федерации. Такая работа представляется исключительно актуальной в связи с тем, что наличие молекулярно-генетических паспортов на выращиваемые породы входит в “Минимальные требования, предъявляемые к селекционно-генетическому центру по разведению карпа, осетровых рыб, радужной форели, пеляди, растительноядных рыб” (приложение 18 к “Правилам в области племенного животноводства

«Виды организаций, осуществляющих деятельность в области племенного животноводства»», утвержденным приказом № 431 Минсельхоза России от 17 ноября 2011 г.).

Однако изучение генетического разнообразия пород радужной форели имеет большое значение и для фундаментальной науки. Это связано, в первую очередь, с тем, что лососевые рыбы уже давно стали модельным объектом для исследований по эволюционной генетике (монографии: Глубоковский, 1995; Алтухов и др., 1997; Фролов, 2000; Hendry, Stearns, 2004). Кроме того, одомашнивание со времен Ч. Дарвина (Дарвин, 1941) служило моделью эволюции.

Например, есть все основания полагать, что изучение генофонда радужной форели будет способствовать раскрытию причин ее хорошо развитой способности к формированию новых популяций, поскольку данные последних лет показывают, что высокая способность к расселению связана с определенными генетическими особенностями вида (обзор: Орлова, 2011). Очевидно, что для поиска закономерностей такого рода радужная форель подходит как нельзя лучше: не случайно она попала в список наиболее опасных инвазионных видов (Lowe et al., 2004). При проникновении этого вида в водоемы за пределами естественного ареала (обзоры: Crawford, Muir, 2008; Stanković et al., 2015) в 88% случаев происходило изменение экосистем.

По этому показателю радужная форель лидирует среди всех изученных водных организмов (обзор: Garcia-Berthou et al., 2005).

Таким образом, в изучении совокупного генетического потенциала всех пород радужной форели, зарегистрированных в Государственном реестре селекционных достижений РФ, и выявлении генетических особенностей каждой из них заинтересованы специалисты самых разных областей науки и производства.

#### ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

*Распространение радужной форели и ее внутривидовое разнообразие.* Начиная с публикации работы (Smith, Stearley, 1989) в зарубежной литературе и некоторых отечественных изданиях радужную форель относят к роду *Oncorhynchus*, однако исследования разного рода, в том числе, генетические, показывают, что радужная форель достаточно далеко дивергировала от типичных представителей этого рода (подробности см.: Зелинский, Махров, 2001; Павлов и др., 2001). По этой причине в отечественной литературе для вида принято название *Parasalmo mykiss*.

Ареал радужной форели простирается вдоль тихоокеанского побережья Северной Америки от северной Мексики до Аляски. Она встречается также на российском Дальнем Востоке — на Камчатке и Шантарских островах, а также единично обнаруживается в водоемах материкового побережья Охотского моря, в Амурском лимане и на Командорских островах; в России жилую форму радужной форели называют микижей, проходную — камчатской семгой (монографии: Павлов и др., 2001; Behnke, 2002).

Этот вид отличается высокой пластичностью и представлен целым рядом форм, некоторые из которых ранее считались самостоятельными видами. Мы акцентируем внимание только на тех из них, которые в разное время были использованы в аквакультуре и являются родоначальниками современных пород радужной форели. В первую очередь, это проходная форма — стальноголовый лосось, а также жилые формы радужной форели, исходно обитавшие в реках Запада США. В водоемах тихоокеанского побережья Канады обитает пресноводная форель Камлоопс, которая отличается от других форм радужной форели тем, что эта форма является осеннерестующей, в то время как для всех прочих форм характерен весенний нерест (Keeley et al., 2005; Stephens, 2007).

Большая часть радужной форели, выращиваемой в условиях аквакультуры, ведет свое начало от рыб, одомашненных в 1870-х гг. на базе рыбоводного хозяйства, располагавшегося на р. МакКлауд (McCloud) в Калифорнии. Про-

исхождение первых рыб, которых начали разводить искусственно, точно неизвестно, однако, судя по всему, их родоначальниками была не только жилая форма радужной форели, но и стальноголовый лосось (Needham, Behnke, 1962). В настоящее время в мире насчитывается десятки пород радужной форели. Селекцию этих пород вели по таким хозяйственно-важным признакам как темп роста, возраст и сезон созревания, плодовитость, гонадосоматический индекс, форма тела, а также по фенам окраски.

В Россию радужную форель завозили неоднократно, причем из разных стран — Германии, Дании, Чехословакии и др. (Породы радужной форели ..., 2006). Так, в 1965–1970 гг. в СССР из США была импортирована икра стальноголового лосося (Шатуновский и др., 1970). Кроме того, в 1982 году в нашу страну была завезена форель Дональдсона, полученная в США Л.Р. Дональдсоном в результате 40-летней селекции, а также форель Камлоопс (Титарев, 1988).

В результате гибридизации радужной форели со стальноголовым лососем и последующей селекции (в первую очередь, на раннее созревание) на базе рыбоводного хозяйства “Адлер” (ныне ФГУП «Племенной форелеводческий завод “Адлер”») была получена отечественная порода форели “Адлер”, которая в 1997 году была утверждена в качестве селекционного достижения (Никандров и др., 2002).

Еще одной породой, полученной в России путем гибридизации рыб разного происхождения с последующей селекцией, стала порода “Рофор”, выведенная во ФГУП “Федеральный селекционный государственный центр рыбоводства” (пос. Ропша). Эта порода была утверждена в качестве селекционного достижения в 1999 г. (Породы радужной форели ..., 2006).

Во ФГУП “ФСГЦР” создана также отечественная порода “Росталь”, исходным материалом для выведения которой послужил стальноголовый лосось. Эта порода происходит всего от одной пары тщательно отобранных производителей (Герентьева, 1995). Она была утверждена в качестве селекционного достижения в 2002 году (Породы радужной форели ..., 2006).

Происхождение рыб, завезенных в Адлер с Чегемского рыбоводного завода, и послуживших основой для выведения отечественной породы “Адлерская янтарная”, проследить не удалось. При выведении этой породы на базе ФГУП «Племенной форелеводческий завод “Адлер”» селекцию вели, в первую очередь, с целью закрепления фенов окраски, соответствующих цветовой гамме природного янтаря.

Этот тип окраски оказался кодоминантным. Порода “Адлерская янтарная” была зарегистрирована в качестве селекционного достижения в 2003 году (Шиндавина и др., 2005).

В 2015 г. в “Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию” ([http://www.gossort.com/docs/rus/REESTR\\_SKOT2015.pdf](http://www.gossort.com/docs/rus/REESTR_SKOT2015.pdf)) фигурируют три породы радужной форели зарубежного происхождения — форель Дональдсона (оригинаторы — ФГУП ПФЗ “Адлер”, ФГУП ПФЗ “Чегемское”), форель Камлоопс (оригинаторы — ФГУП ПФЗ “Адлер”, ФГУП ПФЗ “Чегемское”) и лосось стальноголовый (оригинаторы — ФГУП ПФЗ “Адлер”, ЗАО СПЗ “Форелевый”). В нем значатся также две отечественные породы — “Рофор” и “Росталь” — созданные на базе ФГУП “ФСГЦР” и две — “Адлер” и “Адлерская янтарная” — созданные на базе ФГУП «ПФЗ “Адлер”». Всего на территории России в настоящее время существуют племенные маточные стада семи пород радужной форели.

*Генетические маркеры радужной форели и их пригодность для идентификации пород.* В отличие от пород рогатого скота, пушных зверей и кур, генетические характеристики которых интенсивно изучаются (монографии: Генофонды сельскохозяйственных животных ..., 2006; Глазко и др., 2012), изучение генофонда пород рыб, в частности лососевых, только начинается. На этом этапе очень важно выбрать адекватные методики, позволяющие диагностировать породы и оценивать генетическое разнообразие внутри них.

Метод **хромосомного анализа** не может использоваться для генетической паспортизации, ввиду того, что он очень трудоемок и не обладает необходимой степенью разрешения, хотя хромосомный полиморфизм у радужной форели отмечали неоднократно (Colihueque et al., 2001; обзор: Зелинский, Махров, 2001).

Первоначально для генетической паспортизации пород радужной форели применяли **аллозимный анализ**, и в ряде случаев различия между породами форели по частотам аллелей аллозимов действительно были найдены (Busack et al., 1979; Guyomard, 1981; Kincaid, 1981; Thompson, 1985; Koljonen, 1986; Паавер, 1988; Nakajima, Fujio, 1988; van der Bank et al., 1992; Wangila, 1994; Winkler et al., 1995; Породы радужной форели ..., 2006). Однако разрешающая способность данного метода была явно недостаточной: значимые различия между тестируемыми породами удавалось обнаружить далеко не всегда, и только по некоторым локусам. При этом породную принадлежность не

выборки, а каждой конкретной особи определить обычно не представлялось возможным.

Более того, различия того же порядка были обнаружены не только между породами, но и между выборками форели Дональдсона, выращиваемой в отечественных хозяйствах, расположенных в разных регионах (в Ропше и в Адлере) (Породы радужной форели..., 2006, с. 71, с. 226). Трудно сказать, повлиял ли на этот результат процесс отбора на устойчивость к конкретным условиям выращивания или имели место случайные процессы в одной или обеих линиях, однако ясно, что в данном случае характеристика двух маточных стад по аллозимам не позволяет продемонстрировать их большую близость друг к другу, чем к маточным стадам других пород радужной форели. Таким образом, аллозимный анализ не позволил в данном случае получить адекватную характеристику породы.

С тех пор, как были развиты более чувствительные методы молекулярно-генетического анализа (основанные на анализе ДНК), аллозимный анализ все реже используется на практике. Это связано отчасти с тем, что при сборе образцов требуется их глубокая заморозка (-70°C), что не всегда осуществимо. К тому же подавляющее большинство полиморфных аллозимных локусов представляют собой двух- или трехаллельные системы, а столь небольшое число аллелей требует, как правило, чрезвычайно больших выборок (сотни экземпляров) для регистрации тонких различий между популяциями или селекционируемыми линиями. Между тем, изъятие сотен особей неприемлемо в условиях племенного хозяйства.

К числу достоинств аллозимного анализа относится то, что он базируется на полиморфизме белков, которые всегда имеют вполне определенную функцию в клетке и организме в целом, а значит, могут попадать под действие отбора непосредственно (монография: Глазко, Созинов, 1993).

В то же время, следует отметить, что селекция пород лососевых рыб происходила, как правило, не по одному, а по целому комплексу критериев одновременно (например, учитывался возраст созревания, гонадо-соматический индекс и время начала нереста). Кроме того, в разных племенных хозяйствах селекция часто шла в одном и том же направлении, но благодаря разному исходному материалу и различию в условиях содержания полученные породы рыб отличались друг от друга.

Таким образом, при характеристике пород лососевых рыб методами аллозимного анализа мы вправе ожидать, в основном, сужения

генетического разнообразия за счет утраты редких аллелей, присутствовавших в исходном материале. Наиболее низкий уровень генетического разнообразия методами аллозимного анализа был зарегистрирован у форели Дональдсона, которая хорошо отличается генетически от других линий, разводившихся в СССР (Паавер, 1988). В то же время, вряд ли можно надеяться найти качественные различия между породами радужной форели в виде фиксации у них разных аллелей аллозимных локусов — по крайней мере, на современном этапе селекционного процесса у рыб.

Появлялись указания на различия между породами радужной форели, обнаруженные методом **RAPD-PCR** (Барминцев и др., 2003; Voguerouk et al., 2007; Сексте и др., 2008). Между некоторыми породами были найдены различия с помощью **фингерпринтинга** (разновидность рестриктового анализа) ДНК (Белаш и др., 2003; Терлецкий и др., 2004; Дементьева и др., 2005). Однако, методы анализа, основанные на сопоставлении длин случайных последовательностей генома, не отличаются высокой степенью надежности и зачастую плохо воспроизводимы, поэтому широкого распространения они не получили.

Число гаплотипов **митохондриальной ДНК** даже в природных популяциях лососевых обычно невелико, поэтому использовать этот признак для идентификации пород в целом нецелесообразно. Отметим, однако, что между линиями радужной форели в некоторых случаях наблюдались значительные различия в частотах гаплотипов мтДНК (Palva, Palva, 1987; Danzmann et al., 1993; Sajedi et al., 2003).

В последние годы для генетических исследований радужной форели предложено использовать еще один тип маркеров — **SNP-маркеры** (single nucleotide polymorphism), которые представляют собой точечные мутации в ядерной ДНК (Sprowles et al., 2006; Campbell et al., 2009; Stephens et al., 2009; Abadia-Cardoso et al., 2013; Palti et al., 2015; Liu et al., 2016). Эта группа маркеров, безусловно, весьма перспективна, не в последнюю очередь, потому, что работа с ними может быть автоматизирована и стандартизирована.

Однако, работы, в которых представлены сравнительные характеристики различных пород и селекционных линий лососевых рыб в настоящее время базируются во всем мире, преимущественно, на **анализе микросателлитов**, что обусловлено рядом объективных причин.

Эти маркеры исключительно высокополиморфны. Среднее число аллелей на микросателлитный локус составляет в природных по-

пуляциях лососевых рыб 10–20 аллелей, но в некоторых случаях может достигать до 50 и более (обзор: Артамонова, Махров, 2015).

Кроме того, использование маркеров данного типа (как и анализ митохондриальной ДНК) допускает прижизненное тестирование особей: для получения ДНК достаточно небольшого фрагмента плавника или нескольких чешуй рыбы. Пробы могут быть надежно фиксированы в полевых условиях и имеют почти неограниченный срок хранения — ДНК удается получать из сухой чешуи или коллекционных экземпляров, фиксированных этанолом, даже спустя десятки лет (Nielsen et al., 1997).

Данный метод является самым высокочувствительным среди всех перечисленных выше (возможно, за исключением SNP). Он хорошо работает в тех случаях, когда требуется различать генетически близкие группы организмов (в том числе, различные породы) и позволяет надежно устанавливать родство особей, поскольку сочетание генотипов для разных микросателлитных локусов является, как правило, уникальным для организма (обзор: Avise, 2004). При этом 12–23% микросателлитных локусов оказываются сцепленными с генами, находящимися под отбором (Vasemagi et al., 2005b), а значит, вероятность выявления различий между породами рыб по микросателлитным локусам достаточно высока.

Имеющиеся в настоящее время литературные данные, как правило, недостаточны, чтобы сделать вывод о том, является ли данный конкретный локус селекционно-нейтральным или может находиться под отбором. Известно, однако, что такие популярные у исследователей локусы, как, например, *Ssa197* и *Ssa171*, используемые при изучении популяций атлантического лосося, радужной форели и других лососевых рыб, находятся под отбором достаточно часто (Spidle et al., 2003; Vasemagi et al., 2005a). Новые факты, касающиеся отбора по таким локусам в процессе селекции, могут вывести на сцепленные с ними гены, отвечающие за хозяйственно-важные признаки.

Микросателлиты успешно использовали для дифференциации природных популяций радужной форели (микижи), включая популяции российской части ареала (McPhee et al., 2007; Семенова и др., 2010; Павлов и др., 2011), а также для оценки генетического разнообразия разводимых рыб, различения заводских и диких рыб, идентификации отдельных семей (ссылки см.: Артамонова, Махров, 2015).

Различия между некоторыми породами радужной форели в частотах аллелей микросателлитных локусов показаны в ряде работ (Бар-

минцев и др., 2003; Ward et al., 2003; Silverstein et al., 2004; Zhao et al., 2006, 2008; Boguerouk et al., 2007; Gross et al., 2007; Glover, 2008). Особо следует отметить работу эстонских исследователей (Gross et al., 2007), где показано, что анализ микросателлитов позволяет определять принадлежность конкретной особи к той или иной породе с точностью от 63 до 100%.

Пока еще каждая исследовательская группа использует свой набор микросателлитных локусов, однако нет сомнений, что в самое ближайшее время набор маркеров, используемых при идентификации пород лососевых рыб, будет стандартизирован.

*Предпосылки для стандартизации набора маркеров при генетической идентификации пород лососевых рыб.* Изучение разнообразия и особенностей наследования генетических локусов у лососевых в настоящее время значительно упрощается, поскольку для радужной форели не так давно были построены подробные карты сцепления (Nichols et al., 2003; Guyomard et al., 2006). В сумме на этих картах локализованы положения более 2 000 различных генетических маркеров. Среди картированных локусов 29 известных генов, 4 аллозимных и 12 микросателлитных локусов, 38 SINE-маркеров, а также 72 VNTR-, 5 RAPD-, 799 EcoRI AFLP-, 174 PstI AFLP-маркера. Определены позиции почти 1000 микросателлитов.

При помощи гибридизации *in situ* карты групп сцепления соотнесены с хромосомами радужной форели, и установлено, что всего геном этого вида насчитывает 31 группу сцепления, среди которых 21 метацентрическая и 10 акроцентрических (Guyomard et al., 2006).

Характерно, что в числе микросателлитных маркеров картированы не только локусы, обнаруженные непосредственно у радужной форели, но и микросателлиты, выявленные первоначально у атлантического лосося, кумжи, нерки, кеты, чавычи, кижуча. Относительно целого ряда микросателлитных маркеров уже известно, что они присутствуют в геномах и полиморфны сразу у нескольких видов лососей (Rexroad III et al., 2002; Paterson et al., 2004).

Особенности хромосомной локализации генетических маркеров следует учитывать при выборе спектра тестируемых локусов, используемых для идентификации пород рыб: эти локусы должны представлять, по возможности, разные хромосомы, в том числе и половые. Кроме того, набор маркеров должен быть, в основном, унифицирован и пригоден для использования на разных видах лососей. Поэтому для идентификации пород желательно подбирать локусы, полиморфные сразу у нескольких видов.

Статистические оценки говорят о том, что степень дифференциации популяций по микросателлитным локусам чрезвычайно высока, и для уверенной (около 95%) идентификации принадлежности особи к той или иной выборке обычно достаточно проанализировать 30–50 рыб по 6–8 микросателлитным локусам (O’Connell, Wright, 1997; Hansen et al., 2001; Rengmark et al., 2006). При этом для выявления генетических особенностей породы как целого достаточно тестирования около 30–50 особей по 4–5 микросателлитным локусам.

И, наконец, при отборе генетических локусов, которые целесообразно включить в стандартный набор для идентификации пород лососевых рыб, следует принять во внимание, что в недалеком будущем эти сведения будут активно использоваться в рыбоводной практике, селекции, с целью охраны селекционных достижений. В связи с этим, методика генетического анализа для стандартного набора локусов должна быть единой и максимально простой: желательно, чтобы используемые праймеры имели одинаковую температуру отжига, а диапазон аллельных вариантов каждого локуса располагался в пределах от 90 до 350 п.н.

Это последнее обусловлено необходимостью уверенного распознавания отдельных аллелей микросателлитов при тестировании проб не только при капиллярном электрофорезе, но и на коротких (18–20 см) полиакриламидных гелях, поскольку приборы для капиллярного электрофореза и флуоресцентно меченые праймеры относительно дороги и пока не могут использоваться при массовых исследованиях. С той же целью (уверенное распознавание аллелей) следует отдавать предпочтение три- и тетра-нуклеотидным локусам перед динуклеотидными. Предпочтение тетра-нуклеотидных локусов целесообразно еще и с той точки зрения, что, в среднем, их варибельность выше, чем у динуклеотидных, примерно в два раза (O’Reilly et al., 1996, Garant et al., 2000).

Разумеется, набор микросателлитных локусов, используемых для идентификации пород лососевых рыб, может несколько варьировать от вида к виду, или постепенно меняться с течением времени при появлении новых данных, например, о характере отбора по некоторым маркерам. Тем не менее, получение уже сейчас генетических характеристик пород лососевых рыб на основе изучения разнообразия по ряду общих локусов, будет в значительной мере способствовать прогрессу в селекции и создаст фундамент для охраны селекционных достижений.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

*Материал, использованный для генетического анализа маточных стад радужной форели.* В 2008–2009 гг. в двух хозяйствах — оригинаторах (ФГУП “ФСГЦР” (пос. Ропша) и ФГУП «Племенной форелеводческий завод “Адлер”») был собран биологический материал от особей семи пород радужной форели, официально зарегистрированных в Российской Федерации в качестве селекционных достижений.

**Таблица 1.** Характеристика биологического материала, использованного для паспортизации маточных стад радужной форели

Порода	Хозяйство	Пол и возраст рыб, используемых для паспортизации пород
Стальноголовый лосось	ФГУП ПФЗ “Адлер”	самки 4. (январь 2008 г.) самцы 2. и 3. (январь 2008 г.)
Адлерская янтарная	ФГУП ПФЗ “Адлер”,	самки 4. (январь 2008 г.) самцы 2. (январь 2008 г.)
Адлер	ФГУП ПФЗ “Адлер”	самки 2. (январь 2008) самцы 2. (февраль 2008)
Форель Дональдсона	ФГУП ПФЗ “Адлер”	самки 2. (февраль 2008 г.) самцы 2. (февраль 2008 г.)
Камлоопс	ФГУП ПФЗ “Адлер”	самки 1+ (март 2008 г.) самцы 1+ (март 2008 г.)
Рофор	ФГУП “ФСГЦР”	самки 5. (февраль 2009 г.) самцы 4. (февраль 2009 г.)
Росталь	ФГУП “ФСГЦР”	самки 5. (февраль 2009 г.) самцы 4. (февраль 2009 г.)

*Аmplификация фрагментов ДНК исследуемых локусов.* При выделении тотальной клеточной ДНК использовали метод фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Синтез фрагментов ДНК (полимеразную цепную реакцию — ПЦР), представляющих собой исследуемые микросателлитные локусы, проводили на амплификаторе ТП-2-24 (Производство ООО “Тюльская диагностическая лаборатория”) в 25 мкл буфера для амплификации фирмы “Fermentas”: 10 mM Трис-НСl (рН 8.8); 50 ммоль КСl; 2,0 ммоль MgCl<sub>2</sub>; 0.08% Nonidet P40.

Амплификационная смесь содержала 100-300 нг тотальной клеточной ДНК, по 10 пмоль каждого из двух праймеров (прямого (а) и обратного (б)) для соответствующего локуса, по 200 нмоль каждого из четырех дезоксирибонуклеотидов и 0,5 ед. Таq-полимеразы (производство фирмы “Бионем”, Москва). Сверху, для предотвращения испарения в ходе ПЦР, на смесь наслаивали минеральное масло.

С целью унификации условий проведения микросателлитного анализа, для всех микросателлитных локусов применяли единую стандартную программу амплификации, которая включала в себя этап первоначальной денатурации ДНК — 4 мин., +95°C; 35 циклов синтеза фрагмента ДНК: +95°C — 60 сек, +58°C — 50 сек, 72°C — 50 мин, а также этап достройки концов фрагмента: +72°C, 5 мин.

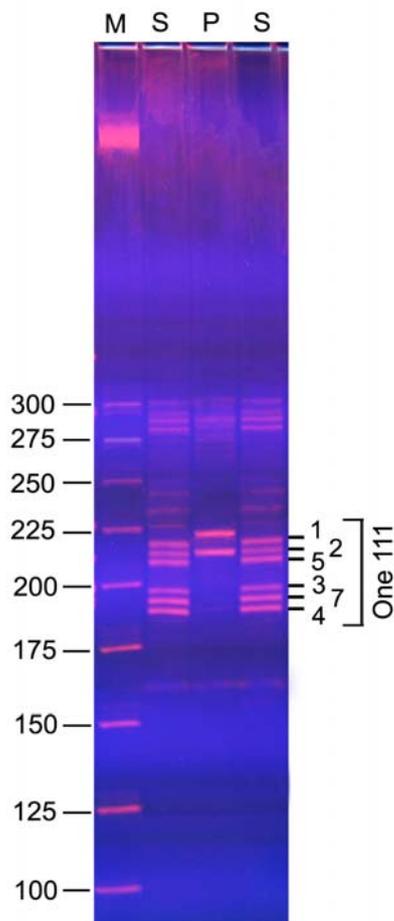
Образцы, из которых получали ДНК для микросателлитного анализа, представляли собой фрагменты жировых плавников рыб (в случае породы “Росталь” — грудных плавников), фиксированных 96% этанолом в соотношении 1:5. Особенности материала, использованного для паспортизации маточных стад радужной форели, представлены в таблице 1. Во всех случаях биологический материал был получен не менее чем от 50 самцов и 50 самок каждой породы.

### *Электрофорез в полиакриламидном геле.*

Анализ длин фрагментов микросателлитных локусов проводили в 6.5–7% полиакриламидном геле в Трис-боратном буфере (89 ммоль Трис-борат, 89 ммоль борная кислота, 2 ммоль ЭДТА рН 8.0) в камере VE-3 для вертикального электрофореза фирмы «Хеликон» (Москва). Эталонными образцами длин фрагментов ДНК служили двунитевые маркеры фирмы «Promega» с шагом 50 пар нуклеотидов в диапазоне от 50 до 800 пар оснований и с шагом 25 пар нуклеотидов в диапазоне от 25 до 300 пар оснований (+ дополнительные фрагменты длиной 1800 п.н. и 800 п.н. соответственно).

После предварительного определения набора аллелей для каждого микросателлитного локуса, при последующих электрофорезах наряду с маркерами «Promega» на гель наносили также стандарты, которые готовили путем смешивания 2–5 ранее тестированных образцов. Образцы подбирали таким образом, чтобы в смеси оказался представлен максимально полный для данного локуса набор аллелей. Этот прием позволял провести сопоставление аллелей, обнаруженных у разных пород, друг с другом, а также более точно определить их подвижности. Кроме того, данный прием позволял уверенно выявлять новые аллели, не представленные в стандарте (рис. 1).

Для визуального наблюдения за ходом электрофореза в лунки геля вместе с пробами наносили смесь красителей бромфенолового синего и ксиленцианола. Смесь красителей (по 0.03%), готовили на 40% сахарозе, содержащей 100 mM Трис-НСl, рН 7.8. Объем смеси красителей составлял около 1/6 от объема пробы.



Электрофорез проводили при напряжении 240–280 V и силе тока 60–100 mA, до прохождения красителем ксиленцианолом расстояния, составляющего около  $\frac{3}{4}$  длины геля (около 15 см, ~3.5 часа).

**Рис. 1.** Выявление нового аллеля (6) локуса *One111* путем сравнения подвижности ПЦР-продуктов анализируемой пробы (лунка Р) со стандартом (лунки S), содержащим известные ранее аллели (обозначены цифрами 1–5, 7 справа). Сравнение показывает, что анализируемая особь гетерозиготна по локусу *One111* и содержит в своем геноме известный ранее аллель 2 и не обнаруживавшийся прежде аллель 6. М — маркер длины с шагом 25 п.н. Цифрами слева обозначены длины фрагментов использованного маркера (п.н.).

*Регистрация результатов микросателлитного анализа в полиакриламидных гелях.* После электрофореза полиакриламидные гели окрашивали раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл, 5–15 мин.), промывали в дистиллированной воде (10–15 мин.) и фотографировали в ультрафиолете ( $\lambda=254$  нм) цифровой камерой “Canon” (PowerShot A620). Полученные изображения заносили в компьютерную базу данных. Длины микросателлитов определяли с использованием компьютерной программы Gel Analysis(Ru).

*Фрагментный анализ.* Для того чтобы результаты микросателлитного анализа в полиакриламидном геле можно было в дальнейшем сопоставлять с данными, получаемыми в ходе капиллярного электрофореза, был выполнен фрагментный анализ микросателлитов. Фрагментный анализ проводили выборочно, таким образом, чтобы в тестируемых образцах были представлены все аллельные варианты каждого

из локусов, выявленные предварительно путем электрофореза в полиакриламидных гелях.

С этой целью проводили амплификацию микросателлитов с выбранных образцов ДНК используя в качестве прямого праймера праймер (F), меченый флуоресцентным красителем FAM. Во всем остальном процесс амплификации был таким же, как описано выше. По окончании амплификации ПЦР-продукты переосаждали в мягких условиях (комнатная температура, 20 мин.), добавляя к пробе, предварительно извлеченной из-под минерального масла, этанол до конечной концентрации 70% и ацетат аммония до конечной концентрации 125 mM. Осадок ПЦР-продукта формировали центрифугированием (центрифуга Eppendorf 5415, 13 000 оборотов/мин., +20°C, 20 мин.), спиртовой раствор сливали. Осадок промывали 500 мкл 70% этанола в течение 20 мин., пробу центрифугировали (центрифуга Eppendorf 5415, 13 000 оборотов/мин., +20°C, 10 мин.), спирт удаляли

водоструйным насосом. Осадок подсушивали в термостате при T=+50°C и растворяли в деионизованной воде, в объеме, равном первоначальному объему пробы.

Каждую аликвоту полученного раствора разводили формамидом в 150 раз и 20 мкл этого раствора вносили в лунку планшета, куда добавляли также по 0.5 мкл раствора флуоресцентного маркера, согласно рекомендациям производителя (Fluorescent Ladder (CXR), 60–400 bases, Promega). Анализ проводили на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems на базе Межинститут-

ского Центра коллективного пользования “Геном” ИМБ РАН. Результаты фрагментного анализа визуализировали и регистрировали с использованием компьютерной программы GeneMarker, v.1.95 ([www.softgenetics.com](http://www.softgenetics.com)).

*Изученные микросателлитные локусы.*  
На основании анализа литературных данных для первого этапа генетической паспортизации маточных стад были выбраны 10 микросателлитных локусов, характеристики которых представлены в таблице 2. Праймеры к этим локусам (табл. 3) были синтезированы на базе биотехнологической компании “Евроген”.

**Таблица 2.** Микросателлитные локусы лососевых рыб, изученные в работе. Литературные источники указаны в табл. 3

Локус и его локализация у радужной форели	Диапазон изменчивости (лит. данные)	Число аллелей (лит. данные)	Число аллелей (эксп.)*	Повторяющийся элемент локуса
SSsp1605	213-305	14	1	(GTТА)25
SSsp2213	151-191	13	1	(GTТА)22
Ssa85 (хромосома 24)	110-138	14	–	(GT)14
Ssa197 (хромосома 21)	131-203	19	3	(GT)5C(TG)4TC(TG)3 A(GTGA)15
Ssa202	267-320	16	–	(CA)3(CTCA)17
Ssa408 (хромосома 1, половая)	176-304	28	11	(GACA)37
Omy1001 (хромосома 18)	176-241	12	10	(CTGT)2...(GTCT)2... (GTCT)2...(GTCT)15
Omy1300 (хромосома 31)	207-275	15	5	(ATCT)10
Omy1212 (хромосома 12)	208-291	22	5	(GACA)13...(GACA)14
One111 (хромосома 10)	194-322	30	8	(TAGA)21

\* — число аллелей, найденных экспериментально, указано по совокупности всех изученных пород радужной форели.

**Таблица 3.** Праймеры к микросателлитным локусам, использованным в работе

Локус и его локализация у радужной форели	Праймеры	Литературный источник
SSsp1605	(F)GGCCAGACAGATAAACAAACACGC (R)GCCAACAGCAGCATCTACACCCAG	Paterson et al., 2004
SSsp2213	(F)ATGTGGAGGTCAACTAACAGCGTG (R)CATCAATCACAGAGTGAGGCACTCG	Paterson et al., 2004
Ssa85 (хромосома 24)	(a)AGGTGGGTCCTCCAAGCTAC (b)ACCGCTCCTCACTTAATC	O'Reilly et al., 1996
Ssa197 (хромосома 21)	(a)GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG (b)TGGCAGGGATTTGACATAAC	O'Reilly et al., 1996
Ssa202	(a)CTTGGAAATATCTAGAATATGGC (b)TTCATGTGTTAATGTTGGCGTG	O'Reilly et al., 1996
Ssa408 (хромосома 1, половая)	(a)TGTGTAGGCAGGTGTGGAC (b)CACTGCTGTTACTTTGGTGATTC	Cairney et al., 2000
Omy1001 (хромосома 18)	(a)GATTCCATAACCTCGCCTTC (b)GTCCTTGTGCTGCCTGCT	Spies et al., 2005
Omy1300 (хромосома 31)	(a)CATGGAGAAAAGACCAATCA (b)TCACTGCCCTACAACAGAAG	Olsen et al., 2000
Omy1212 (хромосома 12)	(a)ACTCACCTAACCTGTCAAGCAATG (b)TGAAAGGGATGGGTTATTATACAGCCC	Spies et al., 2006
One111 (хромосома 10)	(a)ATGACCAAGGAGCTTCTGC (b)TATCCAGGTACTCCACTGGC	Olsen et al., 2000

Согласно литературным данным, все выбранные локусы являются высокополиморфными у радужной форели и все, за исключением локуса *Ssa85*, относятся к числу тетра-нуклеотидных. Для всех локусов, использованных в работе, диапазон варьирования длин фрагментов ДНК, представляющих собой различные аллели, находится в пределах 110–325 п.н., то есть выбранные микросателлитные локусы могут быть протестированы с высокой степенью надежности на коротких полиакриламидных гелях, без применения дорогостоящего оборудования.

Для большинства локусов, исследованных в работе, известно их положение на хромосомах в геноме радужной форели; данные по локализации конкретных микросателлитов также представлены в таблице 2.

*Статистическая обработка результатов.* Для трех локусов — *One111*, *Ssa197* и *Ssa408*, с использованием компьютерной программы TFPGA (Miller, 1997), были сделаны оценки частот аллелей, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. Кроме того, были получены данные по соответствию распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга, оценены генетические дистанции между выборками, построены дендрограммы (по: Nei, 1978). Сравнение частот аллелей в выборках проводили на основании критерия  $\chi^2$  и метода Монте-Карло (Roff, Bentzen, 1989) с использованием программы CHIRXC (Zaykin, Pudovkin, 1993). При обработке данных и построении диаграмм использовали компьютерные программы Microsoft Excel и STATISTICA 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования оказалось, что для локусов *Ssa85* и *Ssa202*, разработанных первоначально для атлантического лосося, при стандартных условиях амплификации, принятых в данной работе, получить ПЦР-продукт, пригодный для анализа с достаточной степенью точности, не удается.

Хотя было очевидно, что данные локусы являются полиморфными, и, изменив условия амплификации, можно получить ПЦР-продукт более высокого качества, мы исключили их из последующего анализа, руководствуясь тем, что для целей практического использования данных, представленных в генетическом паспорте, целесообразно соблюсти единство методики для всех локусов.

Локусы *SSsp2213* и *SSsp1605* были мономорфными у радужной форели и позволяли отличать особей этого вида от другого вида лососевых рыб — кумжи (*Salmo trutta*). Было показано, что в обоих случаях выбранные локусы могут быть амплифицированы с использованием

стандартной программы амплификации, разработанной в рамках данной работы, и позволяют надежно определять видовую принадлежность рыб, а также выявлять межвидовых гибридов.

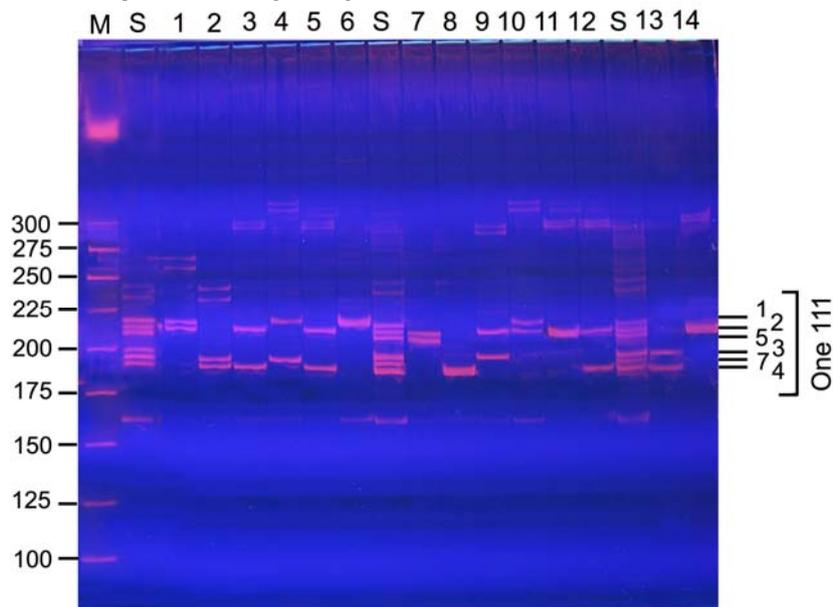
Для шести остальных полиморфных локусов радужной форели стандартные условия амплификации позволяли получать ПЦР-продукт высокого качества. Статус микросателлитных локусов *Ssa197*, *Ssa408*, *Omy1001*, *Omy1300*, *Omy1212* и *One111*, как локусов, полиморфных у радужной форели, подтвердился. При этом следует отметить, что данные об абсолютной длине фрагментов ДНК для всех этих локусов, полученные методом электрофореза в полиакриламидном геле и методом фрагментного анализа, друг с другом не совпадали. Для каждого локуса при пересчете данных одного вида анализа в данные для другого необходимо было вводить систематическую поправку, которая была для каждого локуса своей и составляла от 3 до 7 нуклеотидов, что связано с наличием вторичных структур внутри дунитевых фрагментов ДНК. Наличие вторичных структур сказывается на подвижности молекул при анализе длин фрагментов в неденатурирующих условиях (анализ в неденатурирующем полиакриламидном геле), и потому данные, полученные разными методами, сравнивать напрямую нельзя.

В таблице 2 приведены данные о числе аллелей, обнаруженных в настоящее время у рыб, принадлежащих к породам радужной форели, значащимся в Реестре селекционных достижений. Рисунки 2–7 иллюстрируют аллельное разнообразие микросателлитов, обнаруженных для локусов *Ssa197*, *Ssa408*, *Omy1001*, *Omy1300*, *Omy1212* и *One111*.

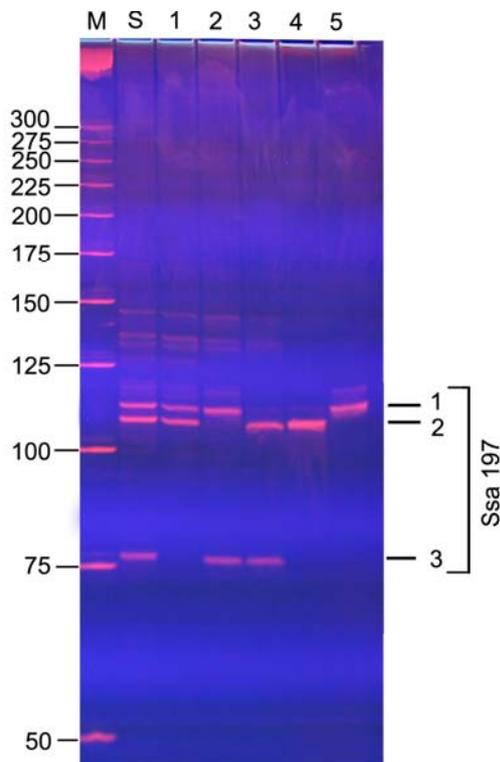
В качестве примера, наиболее подробно представлены данные по разнообразию трех микросателлитных локусов: *One111*, *Ssa197* и *Ssa408*. В локусе *One111* зарегистрировано 8 аллелей, в *Ssa408* — 11 аллелей, в *Ssa197* — 3 (табл. 4). Что касается локуса *Ssa197*, то аллель 3 с подвижностью 76 п.н. встретился в гетерозиготном состоянии только у двух особей стальноголового лосося из 250, протестированных по данному локусу при проведении дополнительных исследований.

Распределение частот генотипов во всех выборках во всех случаях соответствует распределению Харди-Вайнберга. Наблюдаемая гетерозиготность в выборках приводится в таблице 4. Гетерогенность частот аллелей всех изученных локусов между породами была высоко значима ( $p < 0.001$ ). Различия в частотах аллелей при попарном сравнении выборок разных пород в большинстве случаев также были значимы (табл. 5). Генетические дистанции

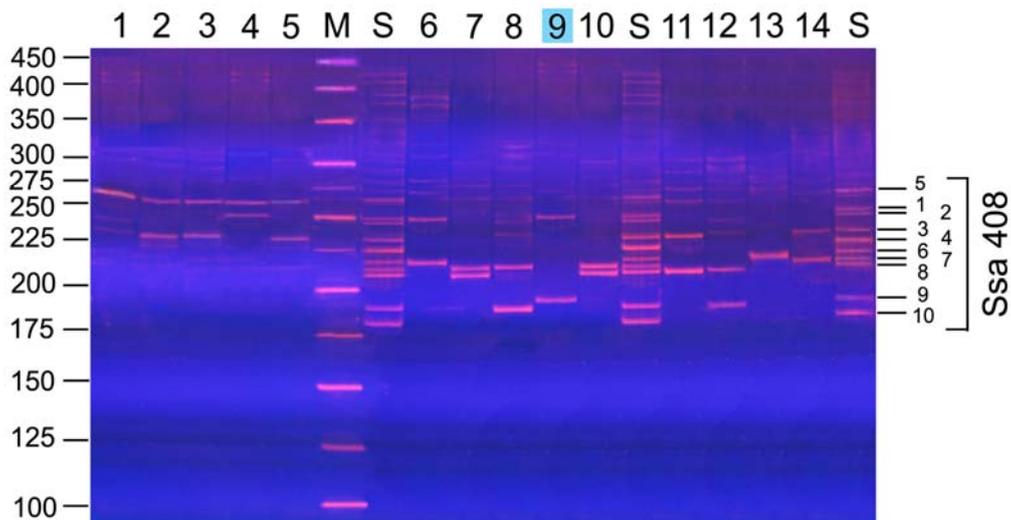
между выборками представлены в таблице 5. Дендрограмма сходства изученных пород приведена на рисунке 8.



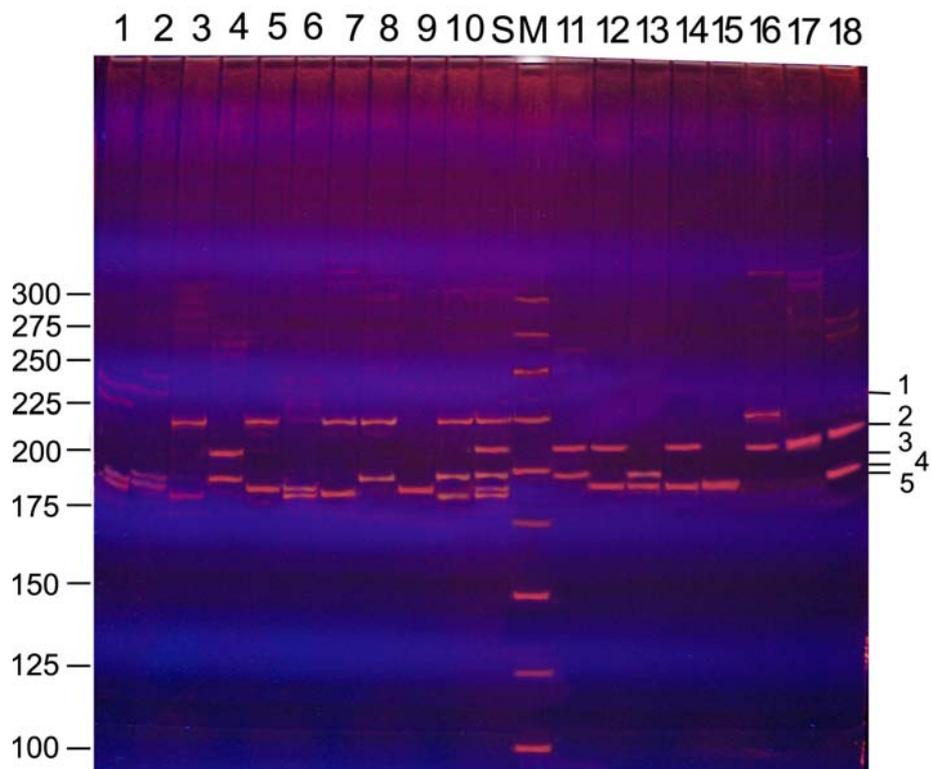
**Рис. 2.** Аллельное разнообразие по локусу *One111*. В составе стандарта (S) представлены аллели 1–5, 7 (обозначения аллелей указаны справа): 1 – 218 п.н., 2 – 214 п.н., 3 – 198 п.н., 4 – 190 п.н., 5 – 210 п.н., 7 – 194 п.н. Аллель 6 (222 п.н.) обнаружен у единственной особи породы “Рофор” (см. Рис. 1). Аллель 8 является 0-аллелем, присутствие которого надежно зарегистрировано только у одной особи форели Дональдсона. М – маркер длины с шагом 25 п.н. Длины фрагментов ДНК в составе маркера указаны слева (п.н.). Лунки 1–6 – ПЦР-продукт, полученный с использованием ДНК радужной форели породы “Росталь”; лунки 7–14 – ПЦР-продукт, полученный с использованием ДНК форели Дональдсона.



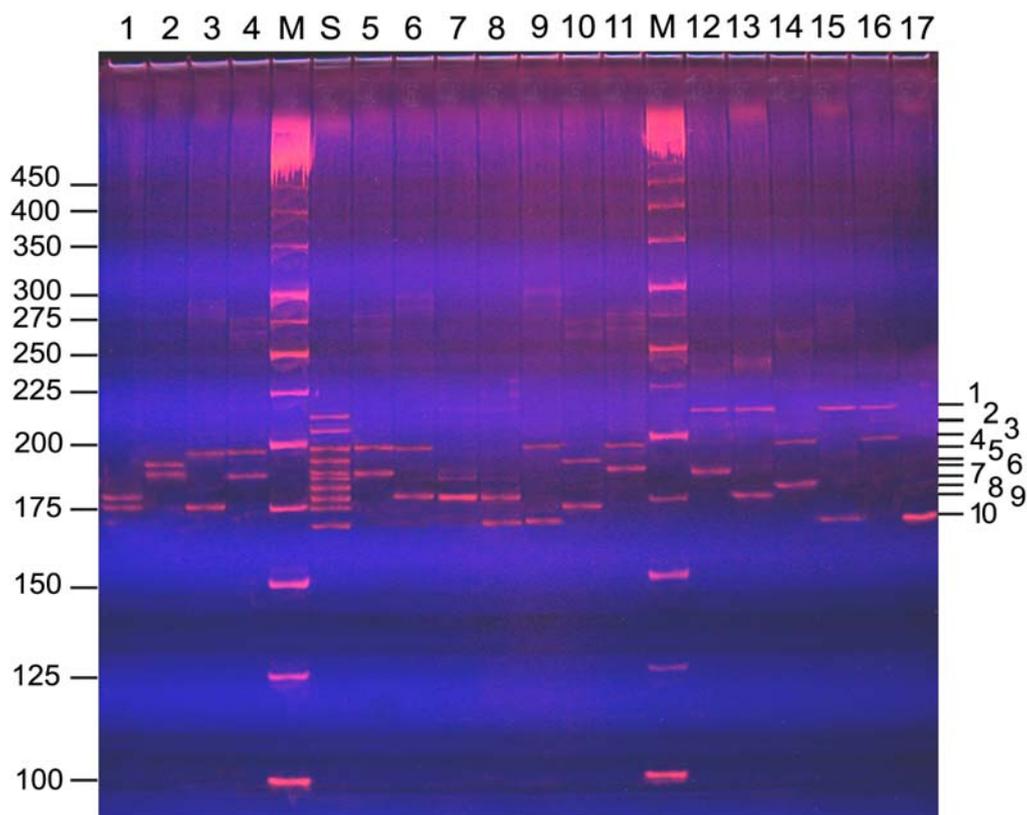
**Рис. 3.** Аллельное разнообразие по локусу *Ssa197*. В стандарте (S) представлены все 3 аллеля (обозначения аллелей даны справа), выявленные в маточных стадах семи исследованных пород радужной форели: 1 – 112 п.н., 2 – 108 п.н., 3 – 76 п.н. Аллель 3 встретился в гетерозиготном состоянии у двух особей стальноголового лосося из 250, тестируемых по данному локусу дополнительно. У рыб других пород этот аллель выявлен не был. М – маркер длины с шагом 25 п.н. Длины фрагментов маркера указаны слева (п.н.). Лунки 1–5 – ПЦР-продукты, полученные с использованием образцов ДНК стальноголового лосося. Представлены все генотипы, наблюдавшиеся для локуса *Ssa197*.



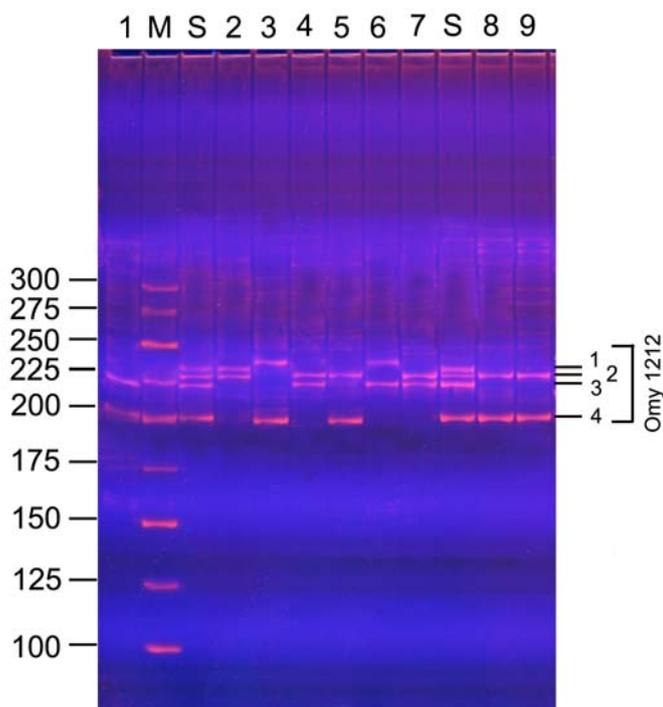
**Рис. 4.** Аллельное разнообразие по локусу *Ssa408*, расположенному в половой хромосоме радужной форели. В составе стандарта (S) представлены 10 аллелей (обозначения даны справа): 1 – 248 п.н., 2 – 244 п.н., 3 – 232 п.н., 4 – 224 п.н., 5 – 264 п.н., 6 – 216 п.н., 7 – 212 п.н., 8 – 208 п.н., 9 – 192 п.н., 10 – 184 п.н. Уникальный аллель 11 (196 п.н.) обнаружен у одной особи породы “Рофор” в гетерозиготном состоянии – лунка № 9. М – смесь маркеров с шагом 25 п.н. и 50 п.н. Длины фрагментов ДНК для маркеров указаны слева. Лунки 1–5 – ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК радужной форели породы “Адлерская янтарная”; лунки 6–14 – ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК радужной форели породы “Рофор”.



**Рис. 5.** Аллельное разнообразие по локусу *Omy1300*. Все аллели, выявленные у семи исследованных пород радужной форели, представлены в составе стандарта (S, нумерация аллелей – справа): 1 – 225 п.н., 2 – 209 п.н., 3 – 197 п.н., 4 – 193 п.н., 5 – 191 п.н. Лунки 1–10 – образцы стальноголового лосося; 11–18 – образцы форели Дональдсона; М – маркер длины с шагом 25 п.н., длины фрагментов маркера указаны слева.



**Рис. 6.** Аллельное разнообразие по локусу *Omy1001*. В составе стандарта (S) представлены все аллели, обнаруженные у семи исследованных пород радужной форели. Обозначения аллелей даны справа: 1 – 113 п.н., 2 – 205 п.н., 3 – 197 п.н., 4 – 193 п.н., 5 – 189 п.н., 6 – 187 п.н., 7 – 181 п.н., 8 – 177 п.н., 9 – 175 п.н., 10 – 169 п.н. М – смесь маркеров длины с шагом 25 п.н. и 50 п.н. Длины фрагментов ДНК в составе маркеров указаны слева (п.н.). Лунки 1–11 – ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК стальноголового лосося, 12–17 – ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК радужной форели породы “Адлер”.



**Рис. 7.** Аллельное разнообразие по локусу *Omy1212*. В составе стандарта (S) представлены аллели 1–4 (обозначения аллелей указаны справа): 1 – 232 п.н., 2 – 228 п.н., 3 – 224 п.н., 4 – 202 п.н. В пробах, нанесенных в лунки 3 и 6, помимо аллелей, представленных в стандарте, имеется аллель 5 с подвижностью 236 п.н. М – маркер длины с шагом 25 п.н. Длины фрагментов ДНК, представленных в составе маркера, приведены слева (п.н.). Лунки 1–9 – ПЦР-продукт, полученный с использованием ДНК радужной форели породы “Адлерская янтарная”.

**Таблица 4.** Число аллелей микросателлитных локусов и наблюдаемая гетерозиготность (в скобках) в изученных выборках радужной форели

Порода	Локус <i>One111</i>	Локус <i>Ssa197</i>	Локус <i>Ssa408</i>	Средняя
Рофор	6 (0.542)	2 (0.417)	9 (0.792)	17 (0.583)
Росталь	4 (0.750)	2 (0.292)	4 (0.625)	10 (0.556)
Стальноголовый лосось	4 (0.733)	3 (0.467)	6 (0.933)	12 (0.711)
Адлер	3 (0.318)	2 (0.500)	4 (0.727)	9 (0.515)
Адлерская янтарная	4 (0.667)	2 (0.250)	3 (0.750)	9 (0.556)
Форель Дональдсона	5 (0.522)	2 (0.348)	6 (0.696)	13 (0.522)
Камлоопс	2 (0.304)	2 (0.435)	7 (0.913)	11 (0.551)

**Таблица 5.** Генетические дистанции и значимость различий в частотах аллелей между изученными выборками радужной форели (\* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ )

Сравниваемые породы	<i>One111</i>	<i>Ssa197</i>	<i>Ssa408</i>	По трем локусам
Рофор – Росталь	0.187 ***	0.160 *	0.155 ***	0.164
Рофор – Стальноголовый лосось	0.355 ***	0.284 **	0.071 *	0.272
Рофор – Адлер	0.024	0.022	0.437 ***	0.122
Рофор – Адлерская янтарная	0.452 ***	0.449 ***	1.491 ***	0.621
Рофор – Форель Дональдсона	0.029 *	0.014	0.648 ***	0.145
Рофор – Камлоопс	0.443 ***	0.010	0.782 ***	0.257
Росталь – Стальноголовый лосось	0.201 ***	0.003	0.385 ***	0.156
Росталь – Адлер	0.391 ***	0.021	0.372 ***	0.219
Росталь – Адлерская янтарная	0.370 ***	0.035 *	2.268 ***	0.439
Росталь – Форель Дональдсона	0.178 ***	0.092	0.507 ***	0.218
Росталь – Камлоопс	0.847 ***	0.258 ***	0.660 ***	0.524
Стальноголовый лосось – Адлер	0.792 ***	0.086 *	0.330 ***	0.363
Стальноголовый лосось – Адлерская янтарная	0.102 *	0.004	2.835 ***	0.272
Стальноголовый лосось – форель Дональдсона	0.465 ***	0.190 **	0.640 ***	0.387
Стальноголовый лосось – Камлоопс	0.454 ***	0.418 ***	1.044 ***	0.533
Адлер – Адлерская янтарная	0.697 ***	0.176 ***	1.000 ***	0.738
Адлер – форель Дональдсона	0.053 ***	0.007	0.066 ***	0.040
Адлер – Камлоопс	0.703 ***	0.070 *	1.332 ***	0.522
Адлерская янтарная – форель Дональдсона	0.403 ***	0.321 ***	3.011 ***	0.709
Адлерская янтарная – Камлоопс	0.961 ***	0.631 ***	2.155 ***	0.973
Форель Дональдсона – Камлоопс	1.051 ***	0.011	1.570 ***	0.592

## ОБСУЖДЕНИЕ

*Генетическое разнообразие пород радужной форели.* Экспериментальные данные, представленные в Таблице 2, наглядно демонстрируют весьма значительное снижение генетического разнообразия у радужной форели, подвергавшейся селекции и образовавшей самостоятельные породы.

Так, если в шести перечисленных выше микросателлитных локусах у радужной форели из природных популяций зарегистрировано в общей сложности 126 аллелей (литературные данные, ссылки см. в Табл. 2), то у радужной форели семи пород, представленных в маточных стадах ФГУП «Племенной форелеводческий завод «Адлер»» и ФГУП «ФСГЦР» в тех же локусах обнаружено, в общей сложности, лишь около 40 аллелей. Таким образом, у форели, подвергавшейся селекции, генетическое разнообразие по микросателлитам оказывается сниженным не менее чем в 3 раза.

Максимальное число аллелей, которое было нами зарегистрировано у радужной форели — 11 аллелей для локуса *Ssa408*, локализо-

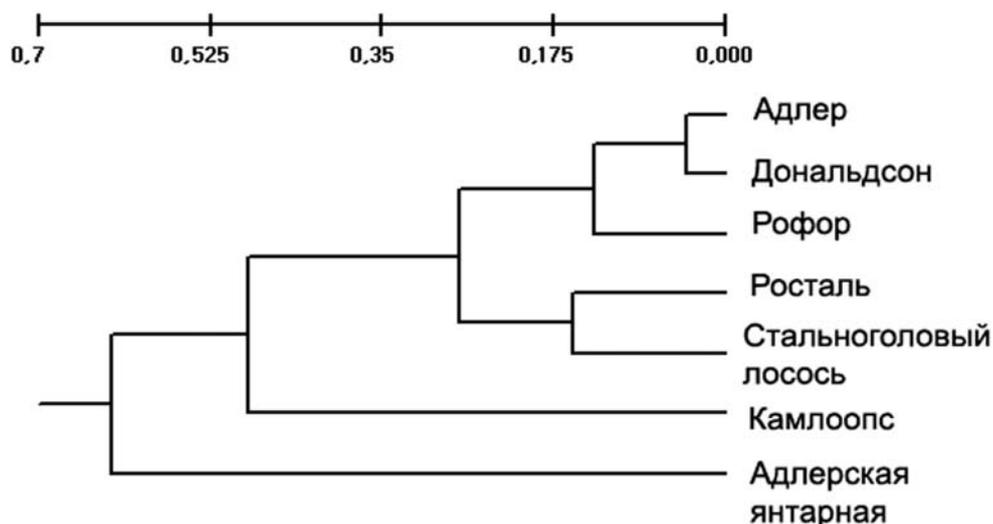
ванного в половой хромосоме, — более чем вдвое уступает числу аллелей, найденных в природных популяциях вида (28 аллелей). Что же касается каждой конкретной породы, то число аллелей этого локуса для любой из них не превышает девяти (табл. 2).

На генетическую адаптацию к искусственным условиям выращивания и влияние селекционного процесса на группы рыб в сторону сужения генетического разнообразия указывает и тот факт, что породы, имеющие разное происхождение, сильно различающиеся как морфологически, так и по времени нереста, имеют, в основном, общий набор аллелей для каждого из исследованных локусов.

Интересно, что форель породы «Росталь», происходящая от одной пары производителей (Терентьева, 1995), сохранила максимально возможный в этом случае уровень генетического разнообразия: в локусах *One111* и *Ssa408* эта группа рыб имеет по четыре аллеля. Очевидно, обе рыбы, ставшие родоначальниками данной породы, были гетерозиготами по двум указанным локусам. Это, вероятно, указывает на то, что при отборе основателей новой породы наи-

более гетерозиготные рыбы проявили наилучшие хозяйственно-ценные признаки. Такая взаимосвязь отмечена в литературе для радуж-

ной форели и других видов лососевых (обзор: Артамонова, Махров, 2015).



**Рис. 8.** Дендрограмма, основанная на генетических дистанциях (Nei, 1978), построенная по совокупности данных для трех изученных микросателлитных локусов – *One111*, *Ssa197* и *Ssa408*.

Возникновение породы “Росталь” может быть моделью происхождения новой популяции радужной форели от пары производителей; необходимо дальнейшее изучение ее генетических особенностей. Оказалось, что генетическое разнообразие у породы “Росталь” хотя и снизилось по сравнению со стальноголового лососем, но не столь значительно, как этого можно было ожидать. В некоторых локусах зарегистрировано более четырех аллелей, причем часть из них не выявлена у стальноголового лосося. Видимо, тесный инбридинг у радужной форели породы “Росталь” привел к росту рекомбинации микросателлитных локусов (Артамонова et al., 2010). Отметим, однако, что тестированный нами стальноголовый лосось происходит от рыб, завезенных в СССР из США, а порода “Росталь” происходит от стальноголового лосося, завезенного в СССР из Финляндии (Породы радужной форели ..., 2006).

Различия в частотах аллелей двух из трех тестированных локусов между стальноголовым лососем и происходящей от него породой “Росталь” значимы (табл. 5). Это говорит о том, что различия в частотах аллелей микросателлитных локусов могут возникнуть уже за несколько поколений, поэтому такие различия не могут быть критерием вида. Между тем, они использовались, например, для обоснования видового статуса некоторых форм миног (ссылки см.: Махров, Попов, 2015).

*Дифференциация пород радужной форели, выявляемая методами микросателлитного анализа.* Несмотря на то, что большинство аллелей микросателлитных локусов являются

общими для всех пород радужной форели, в генофонде практически каждой из них имеются аллели, характерные только для этой породы или для группы пород. Уникальный аллель локуса *One111* есть у форели породы “Рофор”, уникальные аллели по локусу *Ssa408* встречены у пород “Рофор”, “Росталь” и форели Дональдсона. Кроме того, изученные выборки значительно отличаются по частотам аллелей всех изученных локусов.

Распределение изученных выборок на дендрограмме генетических дистанций (рис. 8) отражает историю формирования пород, которые представляют изученные нами выборки. Наиболее сильно дивергировали форель “Адлерская янтарная”, полученная путем селекции радужной форели неустановленного происхождения, и форель Камлоопс, происходящая от изолированной популяции. Далее отделяется ветвь, объединяющая стальноголового лосося и происходящую от него породу “Росталь”. Оставшаяся ветвь объединяет три породы, исходный материал для которых был получен в результате гибридизации рыб, происходящих из нескольких разных популяций – форель Дональдсона, породы “Адлер” и “Рофор”.

#### ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

*Изучение происхождения отдельных групп рыб.* Как отмечено выше, генетическое сходство между породами радужной форели в значительной степени отражает историю происхождения пород. Таким образом, молекулярные маркеры дают возможность изучить про-

исхождение форм радужной форели золотистой окраски, разводимых в нескольких рыбоводных хозяйствах Российской Федерации. Можно сравнить генетические характеристики этих форм и с имеющимися в литературе (Cordes et al., 2006) характеристиками калифорнийской золотой форели (California golden trout).

Значительный интерес представляет изучение групп особей, находящихся в процессе селекции — “зарождающихся” пород радужной форели. Это раннерестующий Камлоопс (“Августин”) и позднерестующий стальноголового лосося (Моисеева, 2015), а также формы золотистой окраски, разводимые в ЗАО СПЗ “Форелевый” (Арсенюк, 2002) и ФГУП “ФСГЦР” (Никандров и др., 2014).

Предварительные оценки показывают, что после создания электронной базы данных, основанной на результатах микросателлитного анализа локусов *One111*, *Ssa197*, *Omy1001*, *Omy1300* и *Ssa407* для 50 рыб каждой породы радужной форели, принадлежность любой конкретной рыбы к определенной породе может быть установлена с точностью не менее 90%. В случае недостаточной точности в определении принадлежности рыб к конкретной породе, в базе данных могут быть дополнительно представлены сведения для микросателлитного локуса *Omy1212*.

*Связь разнообразия микросателлитных локусов с хозяйственно-ценными признаками.* В локусе *Ssa197* нами было зарегистрировано только два аллеля: 1 — аллель с меньшей подвижностью в полиакриламидном геле (112 п.н., “медленный”) и аллель 2 — с большей подвижностью (108 п.н., “быстрый”). Оба аллеля были обнаружены в маточных стадах всех пород радужной форели. Однако частоты этих двух аллелей значительно различались в разных маточных стадах, причем у рыб раннего нереста преобладал «медленный», а у рыб позднего нереста — «быстрый» аллель.

Ранее было отмечено, что локус *Ssa197* может находиться под влиянием отбора в природных популяциях атлантического лосося (Spidle et al., 2003), хотя указаний на связь отбора по этому локусу с конкретными факторами среды в литературе не имеется. Обнаруженная нами корреляция частот аллелей этого локуса со временем нереста позволяет надеяться, что учет этого фактора даст возможность эффективнее вести селекцию, нацеленную на более раннее или более позднее созревание рыб. Косвенным свидетельством в пользу отбора по этому локусу в процессе селекции может служить тот факт, что в работе (Heggenes et al., 2006) у искусственно разводимой радужной

форели также были зарегистрированы только два аллеля локуса *Ssa197*, причем подвижность одного из них (112 п.н.) совпадает с подвижностью аллеля, обнаруженного нами у отечественных пород, и доминирующего у групп рыб с поздним нерестом.

Сцепление микросателлитных локусов с локусами, влияющими на хозяйственно-ценные признаки, интенсивно изучается западными исследователями (Jackson et al., 1998; Sakamoto et al., 1999; Perry et al., 2001; Rodriguez et al., 2004; Sundin et al., 2005; Allen et al., 2014).

*Мониторинг генетического разнообразия.* Как показывают результаты настоящей работы, породы радужной форели в значительной степени генетически обеднены по сравнению с природными популяциями этого вида. Это практически неизбежно, поскольку направленная селекция часто ведет к потере генетического разнообразия. Кроме того, родоначальники ряда пород попадали в Россию достаточно долгими и сложными путями, «теряя» по пути аллели в результате случайных процессов.

В связи с этим целесообразно проведение мониторинга генетического разнообразия пород радужной форели. Полученные в настоящей работе данные могут служить «отправной точкой» такого мониторинга.

*Выявление полиплоидных особей.* В настоящее время все большее значение в аквакультуре приобретает получение полиплоидных, и особенно триплоидных форм рыб. Гонады триплоидных самок радужной форели не развиваются, гонады триплоидных самцов развиваются плохо, поэтому в период полового созревания триплоидная радужная форель опережает по темпу роста диплоидную. Триплоидную радужную форель выращивают в США, Великобритании, Франции, Японии, Корею, Иране, Турции, Польше и Чили (обзор: Piferrer et al., 2009). В России опытное выращивание триплоидной радужной форели осуществлялось на базе ФГУП ПФЗ “Адлер”.

Контроль триплоидии связан с необходимостью определения плоидности большого количества рыб, что может успешно практиковаться с использованием анализа микросателлитов (Lampert et al., 2006). Анализ микросателлитов успешно использован нами для выявления триплоидов радужной форели (Артамонова, Махров, 2015).

## ВЫВОДЫ

1. Все изученные породы радужной форели имеют свою генетическую специфику и могут быть адекватно охарактеризованы методами микросателлитного анализа.

2. Породы радужной форели отличаются пониженным уровнем генетического разнообразия по сравнению с природными популяциями этого вида. Целесообразно проведение мониторинга генетического разнообразия искусственно разводимой радужной форели.

3. С целью выявления внутривидовых триплоидов целесообразно использовать микросателлитный анализ. Такой анализ следует

проводить по двум микросателлитным локусам одновременно, выбирая такие, которые либо наиболее полиморфны у производителей, либо содержат в значительном количестве аллели, уникальные для этой группы рыб.

4. Различия в частотах аллелей микросателлитных локусов могут возникнуть уже за несколько поколений, поэтому такие различия не могут быть критерием вида.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-29-02550, а также Программой “Биоразнообразие природных систем” (подпрограмма “Генофонды живой природы и их сохранение”).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. М.: Наука, 1997. 288 с. (Altukhov Yu. P., Salmenkova E. A., Omelchenko V.T. Salmonid fishes. Population biology, genetics and management. Oxford: Blackwell Science. 2000. 354 p.)
- Арсенюк Н.Г. Способы повышения эффективности использования рыбоводно-технологической базы форелевого хозяйства. Автореф. дисс. ... канд. сельскохозяйств. наук. Краснодар: Кубанский гос. аграрный университет. 2002. 24 с. Arsenuk N.G. Sposoby povysheniia effektivnosti ispolzovaniia rybovodno-tekhnologicheskoi bazy forelevogo khoziaistva. Avtoreferat dissertatsii ... kandidata selskokhoziaistvennykh nauk. Krasnodar: Krasnodarskii gosudarstvennyi selskokhoziaistvennyi universitet. 2002. 24 s. [Arsenuk N.G. Ways to improve the utilization of fish breeding and processing base of trout farm. Abstract of Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Agricultural Sciences. Krasnodar: Krasnodar State Agricultural University. 2002. 24 p.] In Russian
- Артамонова В.С., Махров А.А. Генетические методы в лососеводстве и форелеводстве: от традиционной селекции до нанобиотехнологий. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2015. 128 с. Artamonova V.S., Makhrov A.A. Geneticheskie metody v lososevodstve i forelevodstve: ot traditsionnoi selektsii do nanobiotekhnologii. Moskva: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK. 2015. 128 s. [Artamonova V.S., Makhrov A.A. Genetic Methods in Salmon and Trout Breeding: From Traditional Selection to Nanobiotechnologies. Moscow: KMK Scientific Press Ltd. 2015. 128 p.] In Russian
- Барминцев В.А., Зеленина Д.А., Волков А.А., Савченко И.М., Богерук А.К. Молекулярно-генетическая идентификация пород радужной форели // Материалы межд. симпозиума “Холодноводная аквакультура: старт в XXI век”. Россия, СПб, 8-13 сентября 2003 г. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2003. С. 196–197. Barmintsev V.A., Zelenina D.A., Volkov A.A., Savchenko I.M., Bogeruk A.K. Molekularno-geneticheskaia identifikatsiia porod raduzhnoi foreli // Materialy mezhdunarodnogo simposiyma “Kholodnovodnaia akvakultura: start v XXI vek”. Rossiia, Sankt-Peterburg, 8-13 sentiabria 2003 goda. Moskva: FGNU “Rosinformagrotekh”. 2003. S. 196–197. [Barmintsev V.A., Zelenina D.A., Volkov A.A., Savchenko I.M., Boguerouk A.K. Molecular genetic identification of rainbow trout strains // Proceeding of International symposium "Cold water aquaculture: start in the XXI century", Russia, Saint-Petersburg, September 8-13, 2003. Moscow: FGNU “Rosinformagrotekh”. 2003. P. 196–197.] In Russian
- Белаш Д.Э., Тыщенко В.И., Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Яковлев А.Ф., Голод В.М., Терентьева Е.Г. Изучение генетического разнообразия пород форели методом ДНК фингерпринтинга // Матер. конф., посвящ. 100-летию научной селекции в России. М. МСХА. 2003. с. 191–192. Belash D.E., Tyschenko V.I., Dement'eva N.V., Terletski V.P., Yakovlev A.F., Golod V.M., Terent'eva E.G. Izuchenie geneticheskogo raznoobraziia porod foreli metodom DNK fingerpringinga // Materialy konferentsii posviashchennoi 100-letiiu nauchnoi selektsii v Rossii. Moskva: MSKHA. 2003. S. 191–192. [Belash D.E., Tyschenko V.I., Dementieva N.V., Terletski V.P., Yakovlev A.F., Golod V.M., Terentieva E.G. The study of the genetic diversity of trout strains by DNA fingerprinting // 100th anniversary of the scientific selection in Russia. Proceedings of the conference. Moscow: Moscow Academy of Agricultural Sciences. 2003. P. 191–192.] In Russian
- Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России. М.: Наука. 2006. 462 с. Genofondy sel'skokhoziaistvennykh zivotnykh: geneticheskie resursy zhitovnovodstva Rossii. Moskva: Nauka. 462 s. [Gene pools of farm animals: Genetic resources of animal husbandry in Russia. Moscow: Science. 2006. 462 p.] In Russian
- Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Глазко Т.Т. Введение в геномную селекцию животных. М.: Изд-во “Приятная компания”. 2012. 258 с. Glazko V.I., Kosovskii G.Yu., Glazko T.T. Vvedenie v genomnuu selektsiiu zivotnykh. Moskva: “Priiatnaia kompaniia”. 2012. 258 s. [Glazko V.I., Kosovskii G.Yu., Glazko T.T. Introduction in genomic selection of animals. Moscow: “Nice Company” Press. 2012. 258 p.] In Russian
- Глазко В.И., Созинов И.А. Генетика изоферментов животных и растений. Киев: “Урожай”. 1993. 526 с. Glazko V.I., Sozinov I.A. Genetika izofermentov zivotnyh i rastenii. Kiev: Urozhai, 1993. 526 s. [Glazko V.I., Sozinov I.A. Genetics of isoenzymes of animals and plants. Kiev: Harvest. 1993. 528 p.] In Russian

- Глубоковский М.К. Эволюционная биология лососевых рыб. М.: Наука. 1995. 343 с. Glubokovskii M.K. Evoliut-sionnaia biologiiia lososevykh ryb. Moscow: Nauka, 1995. 343 s. [Glubokovsky M.K. Evolutionary biology of sal-monid fishes. Moscow: "Nauka". 343 p.] In Russian
- Дарвин Ч. 1941. Изменение животных и растений в домашнем состоянии. М.-Л.: ОГИЗ-Сельхозгиз. 619 с. (Dar-win C. The variation of animals and plants under domestication. V. 1. London: John Murray. 1868. 411 p.)
- Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Белаш Д.Э., Голод В.М., Терентьева Е.Г. Генетическое разно-образии и дивергенция некоторых видов и пород лососевых рыб // Генетика, селекция и племенное дело в аквакультуре России. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. С. 188–195. Dementieva N.V., Terletski V.P., Ty-schenko V.I., Belash D.E., Golod V.M., Terentieva E.G. Geneticheskoe raznoobrazie i divergeytsiia nekotorykh vidov i porod lososevykh ryb // Genetika, selectsiia i plemennoe delo v akvakul'ture Rossii. Moskva: "Rosinformagrotekh". 2005. S. 188–195. [Dementieva N.V., Terletski V.P., Tyschenko V.I., Belash D.E., Golod V.M., Terentieva E.G. Genetic diversity and divergence of some species and strains of salmonids // Genetics, selection and breeding in aquaculture of Russia. Moscow: FGNU "Rosinformagrotekh". 2005. P. 188–195.] In Russian
- Захаров В.С. Товарное рыбоводство в Российской Федерации и тенденции его развития // Состояние и перспек-тивы развития пресноводной аквакультуры. М. ВНИИР. 2013. С. 39–42. Zakharov V.S. Tovarnoe rybovodstvo v Rossiiskoi Federatsii i tendentsii ego razvitiia // Sostoianie i perspektivy razvitiia presnovodnoi akvakul'tury. Moskva: VNIIR. 2013. S. 39–42. [Zakharov V.S. Commercial fish farming in the Russian Federation and development trends // Condition and perspective of freshwater aquaculture development. Moscow: All-Russian Re-search Institute of Irrigation Fish Farming. 2013. P. 39–42.] In Russian
- Зелинский Ю.П., Махров А.А. Хромосомная изменчивость, реорганизации генома в филогенезе и систематиче-ские отношения благородных лососей *Salmo* и *Parasalmo* (*Salmonidae*) // Вопр. ихтиол. 2001. Т. 41. № 2. С. 184–191. (Zelinsky Yu.P., Makhrov A.A. Chromosomal variability, genome reorganization in phylogeny, and the systematics of *Salmo* and *Parasalmo* species (*Salmonidae*) // J. Ichthyol. 2001. 41. 209–216.)
- Махров А.А., Попов И.Ю. Жизненные формы миног (*Petromyzontidae*) как проявление внутривидового разно-образия онтогенеза // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 4. С. 240–251. (Makhrov A.A., Popov I.Yu. Life forms of lam-preys (*Petromyzontidae*) as a manifestation of intraspecific diversity of ontogenesis // Russian Journal of Develop-mental Biology. 2015. 46. 196–207. DOI: 10.1134/S1062360415040074)
- Моисеева Е.В. Биологические основы повышения эффективности разведения радужной форели *Parasalmo* (= *Oncorhynchus*) *mykiss* в условиях племенных заводов. Дисс. ... канд. биол. наук. Краснодар: Кубанский гос. университет. 2015. 201 с. Moiseeva E.V. Biologicheskie osnovy povysheniia effectivnosti razvedeniia raduzhnoi foreli *Parasalmo* (= *Oncorhynchus*) *mykiss* v usloviiakh plemennykh zavodov. Dissertatsiia ... kandidata biologicheskikh nauk. Krasnodar: Krasnodarskii gosudarstvennyi universitet. 2015. 201 s. [Moiseeva E.V. The biological bases of increase of efficiency of breeding rainbow trout *Parasalmo* (= *Oncorhynchus*) *mykiss* in a breeding hatcheries. Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Biology. Krasno-dar: Krasnodar State University. 2015. 201 p.] In Russian
- Никандров В.Я., Шиндавина Н.И., Бабий В.А., Янковская В.А., Сртлян В.Е. Характеристика породы радужной форели Адлер и перспективы ее использования // Рыбное хоз-во. Сер. "Актуальные научно-технические проблемы отрасли". 2002. вып. 2. С. 33–58. Nikandrov V.Ia., Shindavina N.I., Babii V.A., Jankovskaia V.A., Srtlian V.E. Kharakteristika porody raduzhnoi foreli Adler i perspektivy ee ispolzovaniia // Rybnoe khoziaistvo. Ser-ria "Aktualnye nauchno-tekhicheskie problemy otrasli". 2002. Vyp. 2. S. 33–58. [Nikandrov V.Ia., Shindavina N.I., Babii V.A., Yankovskaya V.A., Srtlian V.E. Characteristics of the rainbow trout strain Adler and prospects of its use // Fisheries. Current scientific and technical problems of the industry. 2002. P. 33–58.] In Russian
- Никандров В.Я., Шиндавина Н.И., Голод В.М., Терентьева Е.Г. 2014. Вариант желтой окраски у форели Рофор // Рыбное хоз-во. № 2. С. 95–98. Nikandrov V.Ia., Shindavina N.I., Golod V.M., Terenteva E.G. Variant zolotoi okraski u foreli Rofor // Rybnoe khoziaistvo. No. 2. S. 95–98. [Nikandrov V.Y., Shindavina N.I., Golod V.M., Ter-enteva E.G. Yellow color of Rofor trout coloration // Fisheries (Moscow). 2014. 95–98.] In Russian
- Орлова М.И. Биологическая инвазия - горнило для эволюции? // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. № 3. С. 33–46. Orlova M.I. Biologicheskaiia invasiia – gornilo dlia evolutsii? // Ekologicheskaiia genetika. T. 9. No. 3. S. 33–46. [Orlova M.I. Is biological invasion crucible for evolution? // Ecological Genetics. 9. 33–46] In Russian
- Паавер Т.К. Электрофоретическая изменчивость белков и генетические особенности выращиваемых в СССР породных групп и стад радужной форели *Salmo gairdneri* // Вопросы ихтиологии. 1988. т. 28. № 4. С. 595–603. (Paaver T.K. Electrophoretic variation of proteins and genetic characteristics of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, strain groups and stocks reared in the USSR // J. Ichthyol. 1988. 28. 24–31.)
- Павлов Д.С., Савvaitова К.А., Кузицин К.В., Груздева М.А., Павлов С.Д., Медников Б.М., Максимов С.В. Тихоокеанские благородные лососи и форели Азии. М.: Научный мир, 2001. 200 с. Pavlov D.S., Savvaitova K.A., Kuzishchin K.V., Gruzdeva M.A., Pavlov S.D., Mednikov B.M., Maksimov S.V. Tikhookeanskie blagorodnye lososi i foreli Asii. Moskva: Nauchnyi Mir, 2001. 200 s. [Pavlov D.S., Savvaitova K.A., Kuzishchin K.V., Gruzdeva M.A., Pavlov S.D., Mednikov B.M., Maksimov S.V. 2001. The Pacific noble salmon and trouts of Asia. Moscow: Scien-tific World. 200 p.] In Russian
- Павлов С.Д., Семенова А.В., Рубцова Г.А., Афанасьев К.И. Анализ изменчивости микросателлитных локусов у камчатской микижи (*Parasalmo* (*Oncorhynchus*) *mykiss*) // Генетика. 2011. Т. 47. № 10. С. 1346–1356. (Pavlov S.D., Semenova A.V., Rubtsova G.A., Afanasiev K.I. 2011. Analysis of microsatellite variation in the rainbow trout

- Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* from Kamchatka // Russ. J. Genetics. 47. 1198–1208. DOI: 10.1134/S1022795411100139)
- Породы радужной форели (*Oncorhynchus mykiss* W.). М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2006. 316 с. Porody raduzhnoi foreli (*Oncorhynchus mykiss* W.). Moskva: FGNU “Rosinformagrotekh”. 2006. 316 s. [Strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). Moscow: FGNU “Rosinformagrotekh”. 2006. 316 p.] In Russian
- Сексте Э.А., Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Шиндавина Н.И., Яковлев А.Ф. 2008. Молекулярно-генетический анализ гетерогенности пород радужной форели // Докл. РАСХН. № 1. с. 43–46. Sekste E.A., Dementeva N.V., Terletsky V.P., Tyshchenko V.I., Shindavina N.I., Yakovlev A.F. Molekuliarno-geneticheskii analiz geterogennosti porod raduzhnoi foreli // Doklady RASKHN. No. 1. S. 43–46. [Sekste E.A., Dementeva N.V., Terletsky V.P., Tyshchenko V.I., Shindavina N.I., Yakovlev A.F. The molecular genetic analysis (RAPD) of heterogeneity of rainbow trout breeds // The Russian Academy of Agricultural Sciences Reports. 2008. p. 43–46.] In Russian
- Семенова А.В., Рубцова Г.А., Афанасьев К.И., Павлов С.Д. Анализ микросателлитной ДНК у камчатской мишки (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss*). Подбор локусов и оптимизация методики // Генетика. 2010. Т. 46. № 7. С. 1004–1008. (Semenova A.V., Rubtsov G.A., Afanas'ev K.I., Pavlov S.D. Analysis of microsatellite DNA of rainbow trout (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss*) of Kamchatka: Selection of loci and optimization of the method // Russ. J. Genetics. 2010. 46. 891–894. DOI: 10.1134/S1022795410070161)
- Терентьева Е.Г. Создание породы форели Росталь (методика и предварительные результаты) // Проблемы товарного выращивания лососевых рыб России. Мурманск: Изд-во ПИНРО. 1995. С. 36–42. Terent'eva E.G. Sozдание porody foreli Rostal' (metodika i predvaritelnye rezultaty) // Problemy tovarnogo vyrashchivaniia lososevykh ryb Rossii. Murmansk: Izdatelstvo PINRO. 1995. S. 36–42. [Terent'eva E.G. Origin of trout strain “Rostal” (technique and preliminary results) // Problems of commercial breeding of salmonids in Russia. Murmansk: Knipovich Polar Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography (PINRO) Press. 1995. P. 36–42.] In Russian
- Терлецкий В.П., Дементьева Н.В., Тыщенко В.И., Голод В.М., Терентьева Е.Г., Яковлев А.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика некоторых видов рыб семейства лососевых // Цитология. 2004. Т. 46. № 10. С. 868–869. (Terletski V.P., Dementieva N.V., Tyschenko V.I., Golod V.M., Terentieva E.G., Yakovlev A.F. Molecular and genetic characterization of some salmonid fish species // Tsitologiya. 2004. 46. 869–870.)
- Титарев Е.Ф. Новые объекты в форелеводстве страны и перспектива их использования // Сб. научн. тр. ВНИИПРХ. 1988. вып. 54. С. 55–61. Titarev E.F. Novye ob'ekty v forelevodstve strany i perspectiva ikh ispolzovaniia // Sbornik nauchnykh trudov VNIIPRKH. 1988. T. 54. S. 55–61. [Titarev E.F. New facilities in trout farming and the prospect of their use // Proceedings of Russian Research Institute of Freshwater Fish Farming. 54. P. 55–61.] In Russian
- Фролов С.В. Изменчивость и эволюция кариотипов лососевых рыб. Владивосток: Дальнаука, 2000. 229 с. Frolov S.V. Izmenchivost' i evoliutsiia kariotipov lososevykh ryb. Vladivostok: Dalnauka. 2000. 229 s. [Frolov S.V. Karyotype variability and evolution in Salmonidae. Vladivostok: Dalnauka. 2000. 229 p.] In Russian, summary in English
- Шатуновский М.И., Агрба М.А., Котова Н.И. Перевозка и акклиматизация стальноголового лосося в СССР // Труды ВНИРО. 1970. Т. 76. С. 123–129. Shatunovskii M.I., Agrba M.A., Kotova N.I. Perevozka i akklimatizatsiia stalnogolovogo lososja v SSSR // Trudy VNIRO. T. 76. S. 123–129. [Shatunovsky M.I., Agrba M.A., Kotova N.I. Transportation and acclimatization of steelhead in the USSR // Proceedings of All-Union research institute of fisheries and oceanography. 1970. 76. 123–129.] In Russian
- Шиндавина Н.И., Никандров В.Я., Янковская В.А. Порода радужной форели золотистой окраски форель Адлерская янтарная // Сб. научн. тр. ГосНИОРХ. 2005. Вып. 33. С. 161–181. Shindavina N.I., Nikandrov V.Ia., Yankovskaia V.A. Poroda raduzhnoi foreli zolotistoi okraski forel' Adlerskaia Iantartaia // Sbornik nauchnykh trudov GosNIORKh. 2005. T. 33. S. 161–181. [Shindavina N.I., Nikandrov V.Y., Yankovskaya V.A. The strain of rainbow trout golden color Adler amber // Proceedings of State Research Institute of Lake and River Fisheries. 2005. 33. 161–181.] In Russian
- Abadía-Cardoso A., Anderson E.C., Pearse D.E., Garza J.C. Large-scale parentage analysis reveals reproductive patterns and heritability of spawn timing in a hatchery population of steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) // Mol. Ecol. 2013. 22. 4733–4746.
- Allen M.S., Ferguson M.M., Danzmann R.G. Molecular Markers for Variation in Spawning Date in a Hatchery Population of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Mar. Biotechnol. 2014. 16. 289–298.
- Artamonova V.A., Terentyeva E.G., Rysakova K.S., Golod V.M., Makhrov A.A., Boguerouk A.K., Lyzhov I.I. Maintenance and rapid restoration of genetic diversity in an experimental model of the founder effect in the rainbow trout // The III International Symposium "Invasion of alien species in Holarctic. Borok – 3". Programme and Book of Abstracts. October 5th–9th 2010, Borok - Myshkin, Yaroslavl District, Russia. Editors: Yu. Slynko, Yu. Dgebuadze, A. Krylov, D. Karabanov. Yaroslavl: Print-House Publ. Co. 2010. p. 33.
- Avise J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Second Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 684 p.
- Behnke R.J. 2002. Trout and salmon of North America. New York etc.: The Free Press. 360 p.
- Boguerouk A.K., Volkov A.A., Zelenina D.A., Barmintsev V.A. Discrimination of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) strains by the microsatellite and RAPD-PCR analysis // Aquaculture. 2007. 272. S. 246.

- Busack C.A., Halliburton R., Gall G.A.E. Electrophoretic variation and differentiation in four strain of domesticated rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Can. J. Genet. Cytol. 1979. 21. 81–94.
- Cairney M., Taggart J.B., Hoyheim B. Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids // Mol. Ecol. 2000. 9. 2155–2234.
- Campbell N.R., Overturf K., Narum S.R. Characterization of 22 novel single nucleotide polymorphism markers in steelhead and rainbow trout // Mol. Ecol. Res. 2009. 9. 318–322.
- Colihueque N., Iturra P., Estay F., Díaz N.F. Diploid chromosome number variations and sex chromosome polymorphism in five cultured strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // Aquaculture. 2001. 198. 63–77.
- Cordes J.F., Stephens M.R., Blumberg M.A., May B. Identifying introgressive hybridization in native populations of California golden trout based on molecular markers // Trans. Amer. Fish. Soc. 2006. 135. 110–128.
- Crawford S.S., Muir A.M. Global introductions of salmon and trout in the genus *Oncorhynchus*: 1870–2007 // Rev. Fish. Biol. Fisheries. 2008. 18. 313–344.
- Danzmann R.G., Ferguson M.M., Arndt S.K.A. Mitochondrial DNA variability in Ontario and New York rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Can. J. Zool. 1993. 71. 1923–1933.
- Garant D., Dodson J.J., Bernatchez L. Ecological determinants and temporal stability of the within-river population structure in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Mol. Ecol. 2000. 9. 615–628.
- Garcia-Berthou E., Alcaraz C., Pou-Rovira Q., Zamora L., Coenders G., Feo C. Introduction pathways and establishment rates of invasive aquatic species in Europe // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2005. 62. 453–463.
- Glover K.A. Genetic characterization of farmed rainbow trout in Norway: intra- and inter-strain variation reveals potential for identification of escapees // BMC Genetics. 2008. 9. 87.
- Gross R., Lulla P., Paaver T. Genetic variability and differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in northern and Eastern Europe // Aquaculture. 2007. 272. S139–S146.
- Guyomard R. Electrophoretic variation in four French populations of domesticated rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // Can. J. Genet. Cytol. 1981. 23. 33–47.
- Guyomard R., Mauger S., Tabet-Canale K., Martineau S., Genet C., Krieg F., Quillet E. A type I and type II microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms // BMC Genomics. 2006. 7. 302.
- Hansen M.M., Kenchington E., Nielsen E.E. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers // Fish and Fisheries. 2001. 2. 93–112.
- Heggenes J., Beere M., Tamkee P., Taylor E.B. Genetic diversity in steelhead before and after conservation hatchery operation in a coastal, boreal river // Trans. Amer. Fish. Soc. 2006. 135. 251–267.
- Hendry A., Stearns S., eds. 2004. Evolution illuminated: Salmon and their relatives. Oxford: Oxford University Press. 520 p.
- Jackson T.R., Ferguson M.M., Danzmann R.G., Fishback A.G., Ihssen P.E., O’Connell M., Crease T.J. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families // Heredity. 1998. 80. 143–151.
- Keeley E.R., Parkinson E.A., Taylor E.B. Ecotypic differentiation of native rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations from British Columbia // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2005. 62. 1523–1539.
- Kincaid H.L. Trout strain registry. Kearneysville: National Fisheries Center-Leetown. 1981. 118 p.
- Koljonen M.-L. The enzyme gene variation of ten Finnish rainbow trout strains and the relation between growth rate and mean heterozygosity // Aquaculture. 1986. 57. 253–260.
- Lampert K.P., Lamatsch D.K., Schories S., Hopf A., Garcia de Leon F.J., Scharl M. Microsatellites for the gynogenetic Amazon molly, *Poecilia formosa*: useful tools for detection of mutation rate, ploidy determination and overall genetic diversity // J. Genetics. 2006. 85. 67–71.
- Liu S., Palti Y., Gao G., Rexroad III C.E. Development and validation of a SNP panel for parentage assignment in rainbow trout // Aquaculture. 2016. 452. 178–182.
- Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. 100 of the world’s worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. Auckland: Invasive species specialist group. 2004. 12 p.
- McPhee M.V., Utter F., Stanford J.A., Kuzishchin K.V., Savvaitova K.A., Pavlov D.S., Allendorf F.W. Population structure and partial anadromy in *Oncorhynchus mykiss* from Kamchatka: relevance for conservation strategies around the Pacific Rim // Ecol. Fresh. Fish. 2007. 16. 539–547.
- Miller M.P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA). Version 1.3. A Windows® program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.
- Nakajima M., Fujio Y. Genetic differentiation in cultured populations of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Japan // Tohoku Journal of Agricultural Research. 1988. 38. 35–48.
- Needham P.R., Behnke R.J. The origin of hatchery rainbow trout // Progressive Fish Culturist. 1962. 24. 156–158.
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. 89. 583–590.
- Nichols K.M., Young W.P., Danzmann R.G., Robison B.D., Rexroad C., Noakes M., Phillips R.B., Bentzen P., Spies I., Knudsen K., Allendorf F.W., Cunningham B.M., Brunelli J., Zhang H., Ristow S., Drew R., Brown K.H., Wheeler P.A., Thorgaard G.H. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Animal Genetics. 2003. 34. 102–115.

- Nielsen E.E., Hansen M.M., Loeschcke V. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years // *Mol. Ecol.* 1997. 6. 487–492.
- O’Connell M., Wright J.M. Microsatellite DNA in fishes // *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 1997. 7. 331–363.
- O’Reilly P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K., Wright J.M. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1996. 53. 2292–2298.
- Olsen J.B., Wilson S.L., Kretschmer E.J., Jones K.C., Seeb J.E. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from sockeye salmon // *Mol. Ecol.* 2000. 9. 2155–2234.
- Palti Y., Gao G., Liu S., Kent M.P., Lien S., Miller M.R., Rexroad C.E. III, Moen T. The development and characterization of a 57K single nucleotide polymorphism array for rainbow trout // *Mol. Ecol. Res.* 2015. 15. 662–672.
- Palva T.K., Palva E.T. Restriction site polymorphism in mitochondrial DNA of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, stocks in Finland // *Aquaculture.* 1987. 67. 283–289.
- Paterson S., Piertney S.B., Knox D., Gilbey J., Verspoor E. Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites // *Mol. Ecol. Notes.* 2004. 4. 160–162.
- Perry G.M.L., Danzmann R.G., Ferguson M.M., Gibson J.P. Quantitative trait loci for upper thermal tolerance in out-bred strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Heredity.* 2001. 86. 333–341.
- Piferrer F., Beaumont A., Falguière J.-C., Flajšhans M., Haffray P., Colombo L. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and application to aquaculture for performance improvement and genetic containment // *Aquaculture.* 2009. 293. 125–156.
- Rengmark A.H., Sletten A., Skaala Ø. Lie Ø., Lingaas F. Genetic variability in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) strains estimates by SNP and microsatellites // *Aquaculture.* 2006. 253. 229–237.
- Rexroad III C.E., Coleman R.L., Gustafson A.L., Hershberger W.K., Killefer J. Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries // *Marine Biotechnology.* 2002. 3. 12–16.
- Rodriguez M.F., LaPatra S., Williams S., Famula T., May B. Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses // *Aquaculture.* 2004. 241. 93–115.
- Roff D.A., Bentzen P. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: x2 and the problem of small samples // *Mol. Biol. Evol.* 1989. 6. 539–545.
- Sajedi R.H., Aminzadeh S., Naderi-Manesh H., Sadeghizadeh M., Abdolhay H., Naderi-Manesh M. Genetic variation within and among rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, hatchery populations from Iran assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments // *J. Food Science.* 2003. 68. 870–873.
- Sakamoto T., Danzmann R.G., Okamoto N., Ferguson M.M., Ihssen P.E. Linkage analysis of quantitative loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Aquaculture.* 1999. 173. 33–43.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1989. 1626 p.
- Silverstein J.T., Rexroad III C.E., King T.L. Genetic variation measured by microsatellites among three strains of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) // *Aquaculture Research.* 2004. 35. 40–48.
- Smith G.R., Stearley R.F. The classification and scientific names of rainbow and cutthroat trouts // *Fisheries.* 1989. 14. 4–10.
- Spidle A.P., Kalinowski S.T., Lubinski B.A., Perkins D.L., Beland K.F., Kocik J.F., King T.L., Population structure of Atlantic salmon in Maine with reference to populations from Atlantic Canada // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 2003. 132. 196–209.
- Sprowles A.E., Stephens M.R., Clipperton N.W., May B.P. Fishing for SNPs: A targeted locus approach for single nucleotide polymorphism discovery in rainbow trout // *Trans. Amer. Fish. Soc.* 2006. 135. 1698–1721.
- Stanković D., Crivelli A.J., Snoj A. Rainbow Trout in Europe: Introduction, Naturalization, and Impacts // *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture.* 2015. 23. 39–71.
- Stephens M.R. Systematics, genetics and conservation of golden trout. Dissertation submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree of doctor of philosophy. Davis: University of California. 2007. 149 p.
- Stephens M.R., Clipperton N.W., May B. Subspecies-informative SNP assays for evaluating introgression between native golden trout and introduced rainbow trout // *Mol. Ecol. Res.* 2009. 9. 339–343.
- Sundin K., Brown K.H., Drew R.E., Nichols K.M., Wheeler P.A., Thorgaard G.H. Genetic analysis of a developmental rate QTL in backcrosses of clonal rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // *Aquaculture.* 2005. 247. 75–83.
- Thompson D. Genetic identification of trout strains // *Aquaculture.* 1985. 46. 341–345.
- van der Bank F.H., Swart M.K.J., Ferreira J.T. Genetic variation in nine rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations in South Africa // *Comparative Biochemical Physiology.* 1992. 103B. 2. 495–499.
- Vasemagi A., Gross R., Paaver T., Koljonen M.-L., Säisä M., Nilsson J. Analysis of gene-associated tandem repeat markers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations: implications for restoration and conservation in the Baltic Sea // *Conserv. Genet.* 2005a. 6. 385–397.
- Vasemagi A., Nilsson J., Primmer C.R. Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // *Mol. Biol. Evol.* 2005b. 22. 1067–1076.
- Wangila B.C.C. Electrophoretic characterization of three hatchery-reared strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) // *Aquaculture and Fisheries Management.* 1994. 25. 565–570.

- Ward R.D., Jørstad K.E., Maguire G.B. Microsatellite diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) introduced to Western Australia // *Aquaculture*. 2003. 219. 169–179.
- Winkler F.M., Diaz N.P., Estay F. Allozyme variation in three commercial strains of rainbow trout in Chile // *Aquaculture*. 1995. 137. 45.
- Zaykin D.V., Pudovkin A.I. Two programs to estimate Chi-square values using pseudo-probability test // *J. Heredity*. 1993. 84. 152.
- Zhao Y.-Y., Zhu X.-C., Sun X.-W. Genetic diversity of the cultured populations of six rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by microsatellite // *Hereditas* (Beijing). 2006. 28. 956–962 (English abstract).
- Zhao Y., Zhu X., Sun X. Microsatellite diversity in cultured populations of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in China // *J. Fish Biol.* 2008. 73. 1249–1255.

## **GENETIC DIFFERENTIATION OF RAINBOW TROUT (*PARASALMO MYKISS*) STRAINS BRED IN THE RUSSIAN FEDERATION**

**V. S. Artamonova<sup>1</sup>, V. A. Yankovskaya<sup>2</sup>, V. M. Golod<sup>3</sup>, A. A. Makhrov<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> *A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution;*

*33 Leninsky pr., 119071 Moscow, Russia; e-mail: valar99@mail.ru*

<sup>2</sup> *OOO “Merke”, Sovetskaia str., 46, 143980, Zheleznodorozhnyi town, Moscow region;*

*e-mail: v.yankovskaya@gmail.com*

<sup>3</sup> *Federal Centre for Fish Genetics and Selection,*

*188514, Strel'ninskoe s., 4, Ropsha, Leningrad region; e-mail: ropshatrout@yandex.ru*

<sup>4</sup> *A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution;*

*33 Leninsky pr., 119071 Moscow, Russia; e-mail: makhrov12@mail.ru*

The genetic diversity of all rainbow trout (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss*) strains included in the State Registry of Breeding Achievements of the Russian Federation, namely, Donaldson trout, Kamloops trout, steelhead salmon, “Rofor”, “Rostal”, “Adler”, and “Adler Amber”, has been studied for six microsatellite loci (*Ssa197*, *Ssa408*, *Omy1001*, *Omy1300*, *Omy1212*, and *One111*). The allele frequency heterogeneity for all these loci among the strains studied is highly significant ( $p < 0.001$ ). Although most microsatellite alleles are common for all the rainbow trout strains, the gene pool of practically each of them contains alleles that are specific for this strain or a group of strains. The results of the study can be used for solving practical tasks, such as identifying the strain of a specimen, monitoring genetic diversity, and detecting triploids. In addition, genetic differentiation of rainbow trout breeds reflects the characteristics of the initial stages of the evolutionary process involved in the formation of a new population; therefore, these data may be useful for constructing evolutionary models.

*Keywords:* microsatellites, alien species, microevolution, domestication, rainbow trout, steelhead salmon, strains.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМ ФИЛОГЕНИИ И ФИЛОГЕОГРАФИИ СИГОВЫХ РЫБ (COREGONIDAE)

Е. А. Боровикова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: elena.ibiw@gmail.com*

Сиговые рыбы — пластичная и многообразная группа, населяющая холодноводные экосистемы Голарктики. В представленной обзорной работе проводится анализ результатов молекулярно-генетических исследований сиговых рыб за последние несколько десятилетий, обсуждаются причины их исключительной морфо-экологической пластичности. Показано, что существенно пролить свет на генетические аспекты дивергенции форм, и, далее, эволюционного процесса, позволяет лишь комплексное использование разных методических подходов в рамках определенной концепции, а именно исследование изменчивости на уровне ДНК, экспрессии генов в комплексе с изучением фенотипического полиморфизма. Несмотря на то, что многие полученные на данный момент результаты требуют дальнейшего кропотливого анализа и осмысления, молекулярно-генетические методы, несомненно, могут успешно применяться в решении широкого спектра проблем таксономии, филогении, филогеографии сиговых рыб, разработке теоретических основ механизмов видообразования, оценке современного состояния и динамики генетического разнообразия популяций и видов с целью создания систем мониторинга и управления их ресурсами. Залог этого — корректная постановка проблемы исследования и соответствующий выбор методов и маркеров с учетом их достоинств и недостатков.

*Ключевые слова:* сиговые рыбы, молекулярно-генетические методы, генетический полиморфизм, видообразование.

### ВВЕДЕНИЕ

Сиговые рыбы (сем. Coregonidae) — многообразная группа, населяющая пресноводные экосистемы Голарктики, о которой Линдси и Вуде говорили как о “квинтэссенции эволюции” в связи с изобилием форм, экотипов, внутри- и межвидовых гибридов (Lindsey, Woods, 1970, цит. по: Попов, Сендек, 2003). Широкое распространение и успешная колонизация озер и рек Севера вслед за отступающим ледником поддерживает интерес к сиговым как к динамичной модельной системе, способствующей пониманию механизмов адаптивной эволюции и экологического видообразования время (Østbye et al., 2006; Rogers, Bernatchez, 2007; Bernatchez et al., 2010; Vonlanthen et al., 2012; Hirsch et al., 2013; Præbel et al., 2013; Rogers et al., 2013; Jacobsen et al., 2016). Так, еще в прошлом веке проблемам систематики, таксономии, филогении и филогеографии сиговых была посвящена целая серия работ шведского ихтиолога Свардсона (Svärdson, 1949, 1950, 1952, 1979); те или иные дискуссионные вопросы обсуждаются и в ряде более поздних публикаций (Lindsey, 1981; Решетников, 1995, 2010; Попов, Сендек, 2003; Douglas et al., 2005). Исследователями в разное время ставились такие проблемы, как валидность видов сиговых, в том числе эндемичных, широта их распространения, число видов в определенных регионах; решались вопросы филогеографии, адаптивной дивергенции морфо-экологических форм и эво-

люционных линий, гибридизации между формами, линиями и видами сиговых, обсуждался статус и происхождение симпатричных форм (обзоры: Hudson et al., 2007; Боровикова, Махров, 2009, 2013).

К сожалению, методы и подходы на основе анализа морфологических, экологических, физиологических особенностей группы не позволяют ответить на поставленные выше вопросы: возможность решить их появилась лишь с развитием молекулярно-генетических методов анализа, применением молекулярно-генетических маркеров. Молекулярно-генетические маркеры широко используются биологами уже на протяжении нескольких десятилетий. В отличие от любых морфологических признаков, которые специфичны для групп организмов, эти маркеры характеризуются значительной степенью универсальности, обладают высокой разрешающей способностью (возможность идентификации отдельных особей), а генетические дистанции задают универсальную метрику различий, приложимую ко всем группам организмов (обзор: Artamonova, 2007(b); Абрамсон, 2009). Анализ публикаций, посвященных сиговым рыбам, позволяет выделить ряд периодов, в течение которых менялись предпочтения исследователей в использовании тех или иных молекулярно-генетических методов и, соответственно, менялись проблемы и задачи, решаемые с их помощью (табл. 1).

**Таблица 1.** Основные периоды в исследованиях сиговых рыб с использованием молекулярно-генетических методов (таблица составлена по результатам анализа более 300 литературных источников)

Период времени, гг.*	Основные решаемые вопросы и проблемы	Методы и подходы	Примеры работ
1965–1985	Генетическое разнообразие и дифференциация популяций, филогения, идентификация видов	Исследование полиморфизма ферментативных и неферментативных белков; аллозимный анализ	Ferguson et al., 1978; Vuorinen, 1988; Vuorinen et al., 1981; Bodaly et al., 1991; Ermolenko, 1992; Luczynski et al., 1999; Sendek et al., 2012
1985–2005	Филогеография, происхождение популяций, идентификация видов	Изучение полиморфизма митохондриальной и ядерной ДНК, их отдельных фрагментов; ПЦР-ПДРФ анализ, микросателлитный анализ, секвенирование	Reist et al., 1998; Bernatchez, Dodson, 1994; Douglas et al., 1999; Sukhanova et al., 2004; Østbye et al., 2005(a, b); Schulz et al., 2006; Kohlmann et al., 2007; Jacobsen et al., 2012; Vonlanthen et al., 2012
2005–настоящее время	Механизмы адаптивной радиации, формо- и видообразования	Анализ полиморфизма значительных участков генома (в том числе митогенома), исследования, связанные с применением методов анализа экспрессии генов; полногеномное секвенирование нового поколения, РНК-секвенирование, картирование ядерного генома с использованием AFLP-маркеров, гибридизация на ДНК-микрочипах	Rogers, Bernatchez, 2007; Derome et al., 2008; Jeukens, Bernatchez, 2012; Renaut et al., 2012; Gagnaire et al., 2013; Hebert et al., 2013; Evans et al., 2014; Laporte et al., 2015; Jacobsen et al., 2016

\* — началом периода считается появление публикаций, где исследователи используют новый вид маркеров и/или переходят к решению новых вопросов и проблем. Окончание периода приводится условно, поскольку работы с использованием “устаревших” методов продолжаются и в последующий период. Каждый указанный в таблице временной промежуток, таким образом, ограничивает время наиболее активного использования тех или иных методов и маркеров, наибольшего интереса исследователей к конкретным вопросам и проблемам.

#### АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ФЕРМЕНТНЫХ И НЕФЕРМЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Первые работы с использованием методов анализа полиморфизма ферментных и неферментных белков появились во второй половине 60-х годов прошлого столетия и касались вопросов филогении на уровне родов и видов семейства, описанию меж- и внутривидовой генетической дифференциации (Tsuyuki et al., 1966; Chellevald, 1970; Lindsey et al., 1970). В течение следующих двух десятилетий основным методом для оценки уровня генетического разнообразия популяций, уточнения систематического положения той или иной группы сиговых, решения вопросов таксономии становится исследование **аллозимного полиморфизма** (Ferguson et al., 1978; Vuorinen et al., 1981; Ermolenko, 1992; Perelygin, 1992; Politov et al., 2002; Sendek, 2002 и многие др.). Популярен этот метод и в работах, посвященных идентификации видов, внутри- и межвидовой гибридизации, филогеографии (Vuorinen, 1988; Bodaly et al., 1991; Luczynski et al., 1999; Politov et al., 2000; Сендек и др., 2010; Sendek et al., 2012 и др.). Ряд работ был посвящен изучению

отдельных ферментативных систем с целью определения числа локусов, кодирующих их, описанию аллельных вариантов, анализу электрофореграмм (Clayton, Franzin, 1970; Локшина, 1980; Vuorinen, 1984).

Следует отметить, однако, что аллозимный анализ имеет ряд ограничений и недостатков, в частности, трудоемкость при сборе материала: в полевых условиях требуется наличие оборудования, обуславливающего быструю заморозку и хранение проб при температуре -20°C. Кроме того, для значительного числа локусов нельзя исключить селективную значимость разных аллельных вариантов в определенных условиях среды, что снижает ценность данных маркеров в исследованиях филогении и филогеографии (обзоры: Artamonova, 2007(a); Vorovikova et al., 2013; Артамонова, Махров, 2015). При решении вопросов идентификации видов сиговых следует учитывать и тот факт, что ряд видов отличаются друг от друга лишь частотами аллелей используемых в анализе локусов, качественные различия в аллельных вариантах при этом отсутствуют (Bodaly et al., 1991; Politov et al., 2000, 2002; Sendek, 2002).

Поэтому с разработкой методов анализа полиморфизма непосредственно нуклеотидных последовательностей ДНК в середине 80-х годов XX века аллозимы сменил новый тип молекулярно-генетических маркеров — ДНК-маркеры.

#### АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЯДЕРНОЙ ДНК

Первые работы с использованием ДНК были посвящены оценке **кинетики реассоциации ее одноклеточных молекул**; однако метод не нашел широкого применения в связи с его низкой разрешающей способностью (обзор: Боровикова, Махров, 2009). Основным методом изучения полиморфизма ДНК некоторый период времени был **ПДРФ анализ** (полиморфизм длины рестриктных фрагментов; Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP). Первоначально ферментами рестрикции обрабатывали тотальную клеточную ДНК, что требовало, однако, высокого качества (сохранности) материала. Поэтому чаще исследователи работали с тотальной митохондриальной ДНК (мтДНК) (Bernatchez et al., 1988, 1991; Partti-Pellinen et al., 1992; Слободянюк и др., 1993 и др.), отделяя ее от ядерной различными методами (Palva, Palva, 1985; Gonzales-Villasenor et al., 1986; Jones et al., 1988). Анализ результатов первых работ с применением мтДНК показал, что это удобный молекулярно-генетический маркер для решения проблем филогеографии и филогении сиговых (Bernatchez et al., 1991; Partti-Pellinen et al., 1992; Bernatchez, Dodson, 1994). Удобство использования мтДНК как маркера связано с особенностями ее наследования: мтДНК передается по материнской линии и не рекомбинирует, поэтому накопление мутаций в ее молекуле происходит последовательно, причем в 5–10 раз быстрее, чем в ядерном геноме (Awise, 2004).

В дальнейшем развитие технологий амплификации определенных участков ДНК в ходе **ПЦР** (полимеразная цепная реакция; Polymerase Chain Reaction, PCR) и **секвенирования** расширило область применения отдельных фрагментов мтДНК в молекулярно-генетических исследованиях сиговых рыб (табл. 2). Так, с помощью разных маркерных участков получают сведения о генетической структуре видов, дифференциации популяций, в том числе симпатрических (Reist et al., 1998; Brzuzan et al., 2002; Schulz et al., 2006; Kohlmann et al., 2007; Kempter et al., 2010; Kirczuk et al., 2015). С использованием гена, кодирующего первую субъединицу цитохром оксидазы *c* (COI) мтДНК ведутся работы по идентификации видов (программа “Штрих-кодирование жизни”, “Barcode of Life”) (Schlei et

al., 2008). Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей (секвенирование) значительных по длине участков мтДНК дал возможность уточнить полученные ранее данные об особенностях происхождения, филогеографии, филогенетических взаимоотношениях той или иной группы внутри семейства (популяций, форм, видов) (Sukhanova et al., 2002, 2012; Østbye et al., 2005(a); Jacobsen et al., 2012).

В то же время, несмотря на ряд преимуществ мтДНК как маркера, далеко не все проблемы могут быть решены с ее помощью. Так, ограничено применение мтДНК в изучении динамики внутрипопуляционных генетических процессов, исследовании механизмов адаптивной радиации экологических форм в незначительных временных масштабах, измеряемых жизнью нескольких поколений (табл. 2). Широкое применение в связи с этим приобрели **микросателлиты**, которые как маркеры полиморфизма ядерного генома стали своеобразной альтернативой аллозимам.

Микросателлиты — участки ядерного генома (локусы), состоящие из повторяющихся ди-, три- или тетра-нуклеотидных последовательностей. Большое число микросателлитных локусов в сочетании с их высокой вариабельностью делает их хорошим инструментом для выявления генетических различий не только между отдельными популяциями, но и группами особей внутри популяций. Кроме того, микросателлиты широко применяются для исследования внутри- и межпопуляционных демографических процессов: миграции особей, дрейфа генов, резких изменений численности популяций, прохождения популяций через так называемое “горлышко бутылки” (Алтухов, 2003; Abdul-Muneer, 2014; Артамонова, Махров, 2015).

Первые работы, где микросателлиты используются для анализа полиморфизма популяций сиговых рыб, появляются в 90-х годах XX века. Целью их является уточнение происхождения и филогенетических взаимоотношений симпатрических форм сиговых Европы и Северной Америки (Douglas et al., 1999; Turgeon et al., 1999). Следует отметить, однако, что к работам, посвященным изучению филогении и филогеографии на уровне географически удаленных популяций одного вида, и, более того, на уровне разных видов, выполненным с использованием микросателлитов, следует относиться с осторожностью. Возможности микросателлитного анализа в данной области исследований оказываются ограниченными в связи с явлением гомоплазии (независимое возникновение и фиксация одних и тех же аллельных

вариантов в разных филетических линиях). Кроме того, было показано, что микросателлитные локусы, являясь сцепленными с генами, прямо или косвенно могут подвергаться дейст-

вию естественного отбора, и в этом случае ведущую роль в распространении того или иного аллеля будут играть условия среды (обзор: Artamonova, 2007(b); Артамонова, Махров, 2015).

**Таблица 2.** Характеристика разрешающей способности молекулярно-генетических маркеров, используемых в исследованиях рыб семейств Coregonidae

Направление исследования	ядерный геном				митогеном
	аллозимы	микросателлиты	нуклеотидные последовательности структурных и регуляторных генов	участки рДНК	
Исследование филогении на надвидовом уровне	+++	—	+++	+++	+++
Идентификация видов	++	—	+++	+++	+++
Выявление межвидовых гибридов	+++	—	++++	++++	++++*
Выявление внутривидовых гибридов	+	+++	++	—	+
Изучение генетической структуры вида, дифференциации популяций	+++	+++	+++	+	+++
Изучение путей расселения	++	+	++	+	++++
Исследование адаптивной радиации	++	+++	+++	+	++
Изучение внутривидовой структуры	+++	+++	+++	—	++
Исследование динамики внутривидовых генетических процессов	+++	++++	+++	+	++
Оценка генетического разнообразия и его мониторинг	+++	+++	+++	+	+++

Обозначения: “—” — маркер неприменим; “+” — обычно бесполезен; “++” — может быть полезен в отдельных случаях или в сочетании с другими маркерами; “+++” — как правило, дает хорошие результаты; “++++” — надежен, рекомендуется использовать. \* — определение видовой принадлежности матери. В таблице использованы материалы работ (Avisé, 2004; Artamonova, 2007 (a, b); Finger, Klank, 2010; Артамонова, Махров, 2015).

Успешно применяются микросателлиты при исследовании адаптивной радиации сиговых. В результате подобных работ показана необоснованность построения таксономических систем только на основе особенностей морфологии и/или экологии той или иной группы рыб, поскольку образование определенной морфо-экологической формы происходит независимо в каждом конкретном водоеме. Так, обоснована некорректность выделения видов сига по числу жаберных тычинок на первой жаберной дуге (Østbye et al., 2005(b), 2006), выделения острорылого сига, обитающего в Северном море, в отдельный вид *Coregonus oxyrhynchus* (Hansen et al., 2008), выделения видов ряпушек по времени нереста (Delling et al., 2014).

Вместе с характеристикой генетической дифференциации между разными внутривидовыми группами (популяциями, экологическими формами), оценкой степени их репродуктивной изоляции (см. работы: Whiteley, 2007; Saisä et al., 2008; Vonlanthen et al., 2009) микросателлиты позволяют анализировать механизмы дифференциации этих групп. Например, показано, что разные симпатрично обитающие формы

сига озер Центральных Альп появились в каждом водоеме независимо друг от друга согласно модели формообразования “букет видов (форм)” (“species flocks”) (Douglas et al., 1999). Особенности генетической структуры популяций сига Северного моря возникли посредством “изоляции расстоянием” (Hansen et al., 1999). Для симпатричных форм ряпушки (*C. albula*) из озер Швеции микросателлитный анализ в комплексе с анализом полиморфизма двух участков мтДНК однозначно показал независимое происхождение этих форм в каждом озере вследствие параллельной эволюции, а не вторичного контакта групп с разной экологией, возникших аллопатрично (Delling et al., 2014). Исследование инвазии ряпушки в системе рек Инари-Пасвик (Финляндия) выявило возможность быстрого накопления генетических различий между инвазионной и донорными популяциями (одной или несколькими), сохранения высокого уровня генетического полиморфизма вселенцев, отсутствия обычного при инвазиях “эффекта основателя” (Præbel et al., 2013).

Интересные результаты получены в ходе анализа динамики генетической структуры популяций сигов альпийских озер за многолетний

период (Vonlanthen et al., 2012). Так, на основе комплекса данных о фенотипическом разнообразии популяций сига и уровне полиморфизма микросателлитных локусов показано, что в условиях эвтрофикации водоемов происходит снижение уровня генетического полиморфизма и уменьшение дифференциации между разными экологическими формами сига в одном озере; этот процесс авторы назвали “обращенное, повернутое видообразование” (“reversal speciation”).

Следует отметить, однако, что в более поздней работе, посвященной сигу оз. Констанц (Германия), также выполненной с использованием материала за семидесятилетний период времени, снижения внутривидового генетического разнообразия не выявлено (Gum et al., 2014). Исследователи считают, что показателем потока генов между тремя симпатричными формами сига может служить обнаружение новых аллельных вариантов в восьми из одиннадцати проанализированных микросателлитных локусов. Однако, как уточняют сами авторы работы, появление новых аллелей может быть связано и с рыбоводной деятельностью, в ходе которой в озеро вселяли сиговых из других водоемов. Различия в полученных результатах с (Vonlanthen et al., 2012) объясняются применением методических приемов, позволяющих повысить качество получаемых данных при работе с ДНК из образцов чешуи, собранных несколько десятилетий назад (Gum et al., 2014).

В ряде работ, посвященных рассмотрению генетической структуры популяций сиговых, ее динамики, адаптивной радиации, гибридизации между филогенетическими линиями и формами используются **AFLP-маркеры** (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Campbell, Bernatchez, 2004; Mehner et al., 2010; Hudson et al., 2011). Данная группа маркеров позволяет выявлять скрытую генетическую изменчивость в линиях и близкородственных видах, что ранее не удавалось сделать с использованием морфологических и других молекулярно-генетических маркеров. Следует отметить, что для выяснения филогенетических взаимоотношений категорий надвидового таксономического ранга AFLP-маркеры не применимы в связи с их высокой изменчивостью (Алтухов, 2003).

Обращение исследователей к методу AFLP в популяционных работах, вероятно, связано с тем, что он позволяет оценить полиморфизм значительной части ядерного генома, несмотря на анонимность анализируемых регионов (Артамонова, Махров, 2015). Кроме того, значительно упростилась экспериментальная

часть работы: трудоемкий вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле в настоящее время заменен капиллярным электрофорезом; если ранее образующиеся после рестрикции фрагменты связывали с адаптерами, меченными радиоактивными метками, то сейчас для этих целей используют флуоресцирующие красители. Следует отметить, однако, что особенно удобен метод AFLP для построения генетических карт или карт сцепления с локусами количественных признаков (Quantities Trait Loci, QTL) (Krutovskii et al., 1998; Mueller, Wolfenbarger, 1999; цит. по: Алтухов, 2003).

Широкое распространение в последние 15–20 лет определения нуклеотидных последовательностей методом обрыва цепи (секвенирование по Сенгеру) позволило перейти к **анализу однонуклеотидного полиморфизма** (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) определенных участков ядерного генома сиговых рыб. Первоначально популярными были исследования, связанные с использованием фрагментов, входящих в состав рибосомальной ДНК (рДНК), в ходе которых решались вопросы филогенетических отношений групп разного таксономического уровня внутри семейства. Так, байкальского омуля на основе особенностей морфологии и экологии долгое время сближали в происхождении с ледовитоморским омулем (*C. autumnalis*). Исследование полиморфизма межгенного региона рДНК, внутреннего транскрибируемого спейсера (Internal Transcribed Spacer, ITS1) подтвердило большую близость байкальского омуля озерному байкальскому сигу *C. l. baikalensis* (Sukhanova et al., 2004). Использование ITS1 региона рДНК было успешным и в решении вопросов филогенетических взаимоотношений между разными видами семейства Coregonidae (Sajdak, Phillips, 1997).

Однако следует отметить, что использование фрагментов рДНК в филогенетических исследованиях достаточно близких групп (популяций, экологических форм) может быть затруднено высокими скоростями мутационного процесса. С указанной проблемой, в частности, столкнулись исследователи комплекса видов ряпушек из Великих озер Северной Америки, использовавшие в качестве маркера ген 5S рДНК и нетранскрибируемый межгенный спейсер (Nontranscribed Intergenic Spacer, NTS). Оказалось, что накопление мутаций в этом участке генома превышает скорость процесса гомогенизации (генной конверсии), что явилось причиной существования у исследованных экземпляров двух форм 5S рДНК гена: первая типична для соматических клеток, вторая — для клеток зародышевой линии. Авторы отме-

чают, что в ходе экспериментальной работы, включающей этап клонирования, даже для одной особи не было обнаружено двух идентичных вариантов последовательностей, хотя для каждой из них было получено несколько клонов (Sajdak et al., 1998). Очевидно, что без учета указанных выше особенностей, уровень дифференциации между исследуемыми формами (популяциями) может быть существенно завышен.

Интересные результаты получены в ходе исследования дифференциации геномов симпатричных форм ряпушки озера Гросер-Штехлинзе (Германия) при комплексном использовании методов **цитогенетики**, а именно **флуоресцентной гибридизации *in situ*** (Fluorescence *in situ* Hybridization, FISH), и анализа последовательностей генов рДНК и межгенных спейсеров ITS1 и ITS2: между двумя формами выявлены значительные различия в числе копий гена 45S рДНК (Symonova et al., 2013). Авторы считают, что увеличение копий гена рДНК — своеобразный механизм нивелирования увеличения числа копий одного из ретротранспозонов, обычного для геномов рыб. Поскольку реактивация ретротранспозонов, ведущая к увеличению их копийности, происходит в стрессовых для организма условиях, исследователи делают вывод, что формирование ряпушек происходило в очень сжатые сроки. Отметим, что результаты указанной работы еще раз доказывают симпатричное происхождение форм ряпушки озера Гросер-Штехлинзе.

Кроме перечисленных выше методов в ряде работ для анализа внутри- и межвидовой дифференциации сиговых рыб использовались такие методы как **RAPD-анализ** (Random Amplified Polymorphic DNA) и **анализ коротких рассеянных по геному последовательностей** (Short Interspersed Repetitive Elements, SINE) (Hamada et al., 1998; Oreha et al., 2013). Однако в связи с определенными ограничениями данных методов и их критикой, они не нашли широкого применения (Алтухов, 2003; обзор: Агатамонова, 2007(b); Артамонова, Махров, 2015).

Таким образом, второй период в исследованиях сиговых рыб с использованием молекулярно-генетических методов охватывает около двух десятков лет на рубеже XX-XXI столетий (табл. 1). Подробно проблемы, решенные и решаемые в течение нескольких десятилетий, освещены в обзорной работе (Боровикова, Махров, 2009); здесь же кратко отметим лишь основные и наиболее важные результаты. Во-первых, уточнен систематический статус и филогенетические взаимоотношения ряда пред-

ставителей сиговых рыб. Так, однозначно показано, что поллан (*C. autumnalis pollan*), населяющий водоемы Британии, принадлежит группе омулей (Ferguson et al., 1978); безосновательным оказалось выделение острорылового сига Северного моря в отдельный вид *C. oxyrhynchus* (Hansen et al., 2008; Jacobsen et al., 2012). Высказано сомнение о видовом статусе европейской (*C. albula*) и сибирской (*C. sardinella*) ряпушек, поскольку четких различий по ряду молекулярно-генетических маркеров между ними так и не было обнаружено (Borovikova et al., 2013).

Еще одно значимое достижение — решение вопроса о происхождении симпатричных форм сиговых: за редкими исключениями (например, в случае североамериканского сига *C. clupeaformis*) показано, что симпатричные формы образуются в результате адаптивной радиации и формообразования в пределах одного водоема (Østbye et al., 2005(b), 2006; Vonlanthen et al., 2009; Hudson et al., 2011; Delling et al., 2014). Уточнены вопросы филогеографии и происхождения ряда популяций сиговых Европы и Северной Америки, показано существование зон гибридизации между формами и филогенетическими линиями, зон вторичного контакта (Bernatchez, Dodson, 1991; Østbye et al., 2005(a)). Таким образом, в ходе первых двух этапов молекулярно-генетических исследований сиговых рыб на многие вопросы, поставленные еще в работах Свардсона (Svärdson, 1949, 1950, 1952, 1979 и др.), были даны исчерпывающие ответы.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И ЕЕ РОЛИ В ФОРМООБРАЗОВАНИИ СИГОВЫХ

С появлением и развитием методов **секвенирования нового поколения** (Next-Generation Sequencing, NGS), позволяющих в короткие сроки “прочитать” крупные участки генома (от сотен миллионов до миллиардов пар нуклеотидов за один рабочий цикл), методов исследования экспрессии генов и транскриптома (**гибридизация с ДНК- или кДНК-микрочипами** (кДНК — комплементарная ДНК, синтезированная на основе молекулы зрелой мРНК); **количественная ПЦР в реальном времени** (quantitative Real Time PCR, qRT-PCR); **РНК-секвенирование**), а также применение этих методов в комплексе с классическими методами генетического анализа и картирования генома позволило исследователям перейти к еще более сложным проблемам: решаются вопросы, связанные с механизмами адаптивной радиации сиговых на уровне генома, становления репродуктивной изоляции ме-

жду разными морфо-экологическими формами. Появление работ подобного плана обозначило начало следующего периода в молекулярно-генетических исследованиях, посвященных сиговым рыбам (табл. 1).

Особенно успешно перечисленные выше методы применяются в исследованиях симпатричных пар американского сига (*C. clupeaformis*): карликовая (пелагическая) и нормальная (придонная) его формы населяют ряд озер Северной Америки, причем в разных водоемах степень репродуктивной изоляции между формами разная (Bodaly et al., 1992; Lu, Bernatchez, 1999; Lu et al., 2001; Rogers et al., 2002; Rogers, Bernatchez, 2007). Первоначально исследование экспрессии генов с использованием кДНК-микрочипов и количественной ПЦР в реальном времени позволило выявить ряд так называемых кандидатных генов, по уровню экспрессии которых две формы различались наиболее значительно: число их достигает нескольких сотен и составляет 1–3% генома (St-Cyr et al., 2008; Jeukens et al., 2009; Bernatchez et al., 2010).

Среди этого набора участков генома для 8% была установлена связь с определенными биологическими процессами, выделено несколько функциональных групп генов: 1. гены регуляции энергетического метаболизма (метаболизм глюкозы, биосинтез сахаров); 2. регуляции клеточного цикла (длительность интерфазы митоза) и морфогенеза клетки, формирования надклеточных структур; 3. регуляции роста и развития (процессы роста, связанные с морфогенезом, развитием черепа, костей, плавников); 4. регуляции мышечных сокращений; 5. регуляции иммунного ответа (регуляция реакции освобождения тромбоцитов, быстрый иммунный ответ, развитие воспалительной реакции, распознавание антигенов); 6. гены, участвующие в белковом обмене (сборка белковых молекул, регуляция активности пептидаз, развития и регенерации волокон скелетной мускулатуры); 7. регуляции гомеостаза ионов железа в клетках; 8. гены, связанные с функционированием нервной системы (регуляция нейрогенеза, процессов запоминания и распознавания) и поведением (особенности пищевого поведения, локомоции); 9. гены регуляции транспортной функции крови (система транспорта ионов натрия) (Derome et al., 2008; Bernatchez et al., 2010; Filteau et al., 2013; Hebert et al., 2013). С использованием методов картирования локусов количественных признаков выявлена ассоциация этих регионов генома с ключевыми особенностями фенотипа, показано, что эти локусы распределены в небольшом числе групп сцепления, подтверждая предположение о том,

что дивергенция лишь в непротяженных геномных регионах приводит к появлению морфологических, экологических, физиологических различий между формами (Rogers, Bernatchez, 2007; Gagnaire et al., 2013(a)).

Важными для понимания процессов дивергенции форм при адаптивной радиации являются данные об увеличении дифференциальной экспрессии генов в ходе онтогенеза карликового и нормального сига. Так, если эмбрионы разных форм различались по уровню экспрессии лишь 0.8% всех генов, достоверно “работающих” на этой стадии развития, то у мальков дифференциация достигала 11.2%, то есть увеличивалась в 14 раз (Nolte et al., 2009; Renaut et al., 2009). У взрослых особей дифференциально экспрессируется 13.6% генов (Derome et al., 2006; St-Cyr et al., 2008; Whiteley et al., 2008). Таким образом, было высказано предположение, что адаптивная радиация *C. clupeaformis* в большей степени связана с регуляцией работы генома, чем с изменениями кодирующих нуклеотидных последовательностей (St-Cyr et al., 2008; Whiteley et al., 2008; Evans, Bernatchez, 2012; Jeukens, Bernatchez, 2012; Hebert et al., 2013).

Действительно, анализ однонуклеотидных замен (SNP) показал, что в большинстве своем они связаны или с некодирующими последовательностями (интроны, межгенные спейсеры, 5'- и 3'-нетранслируемые области, Untranslated Region, UTR), которые играют существенную роль в регуляции работы генов, или с участками, локализованными за пределами функционально значимых центров белковых молекул (Jeukens, Bernatchez, 2012; Evans et al., 2014; Jacobsen et al., 2016). Обнаружен интересный факт, что даже несинонимичные нуклеотидные замены в кодирующих последовательностях часто не оказывают значимого влияния на функционирование генов, по уровню экспрессии которых между формами обнаружена существенная дифференциация. Так, в последовательности гена синтазы простагландина E карликовой и нормальной форм *C. clupeaformis* обнаружены несинонимичные SNP. Однако они не ведут не только к изменению характерного для каждой формы уровня транскрипции, но и к значительным изменениям морфологии молекулы фермента, ее заряда и полярности (Hebert et al., 2013).

В то же время, в случае последовательностей гена глутатионпероксидазы, для которого между формами сига также были выявлены значительные различия в уровне экспрессии, дифференциация заключалась в единственной синонимичной замене в пределах кодирующего

региона. Хотя изменений в последовательности аминокислот в результате этой замены не происходило, между формами отмечены высокие значения индекса  $F_{ST}$ , что свидетельствует о наличии определенного уровня репродуктивной изоляции. Известно, что при вырожденности генетического кода в ходе трансляции могут быть предпочтения в использовании тех или иных кодонов. Замена предпочитаемого кодона менее используемым влияет на время сборки белковой молекулы, что в дальнейшем сказывается и на ее функционировании (Kimchi-Sarfaty et al., 2007; Dass, Sudandiradoss, 2012). Показано, что для карликовой формы сига *C. clupeaformis* характерен кодон, чаще используемый в трансляции у сиговых; для нормальной формы типичен альтернативный кодон (Hebert et al., 2013).

Приведенные факты заставляют пересмотреть роль мутаций в некодирующих участках генома и синонимичных замен в дифференциации симпатричных форм. Вероятно, дифференциация уровня экспрессии генов значительно быстрее приводит к появлению различий в фенотипе и физиологии, чем изменения в кодирующих последовательностях, хотя оба эти механизма могут работать одновременно. Помимо сигов, подобные данные получены в исследованиях экспрессии генома трехиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus*) (Jones et al., 2012).

Еще один важный вопрос в понимании механизмов адаптивной радиации, который также успешно решается в ходе молекулярно-генетических исследований симпатричных пар североамериканского сига — природа процессов, лежащих в основе формирования репродуктивной изоляции, особенно если между популяциями существует поток генов (так называемое “видообразование в условиях потока генов”, “speciation-with-gene-flow”). Ранее было показано, что гибридизация между карликовой и нормальной формами сига возможна, однако гибриды первого поколения, обладая рядом черт типичных для родительских форм, имеют сниженную жизнеспособность. Еще более низкой выживаемостью характеризуется потомство возвратных скрещиваний (бэк-кроссы), что выражено в их повышенной смертности уже на стадиях эмбрионального развития, замедлении времени эмбриогенеза (Chouinard, Bernatchez, 1998; Rogers, Bernatchez, 2006; Bernatchez et al., 2010).

Исследователями рассматриваются разные причины, ведущие к повышенной смертности гибридов. Так, один из предполагаемых механизмов — несовместимость специфических регионов генома, так называемых “островков дивергенции” (“islands of divergence”),

которые ассоциированы с локусами количественных признаков (QTL): их размер и число увеличивалось с увеличением морфологических и генетических различий между формами (Rogers, Bernatchez, 2007; Renaut et al., 2012). Кроме того, анализ транскриптомов гибридов выявил нарушения в экспрессии ряда генов, и в первую очередь — ответственных за энергетический метаболизм (Derome et al., 2008; Bernatchez et al., 2010). **RAD-секвенирование** (Restriction Site Associated DNA) позволило оценить степень несогласованности в работе гибридных геномов: оказалось, что у эмбрионов бэк-кроссов 15% транскриптов экспрессировалось дифференциально, тогда как у гибридов первого поколения доля их составила всего 1.5% (Dion-Côté et al., 2014). Интересно, что авторы последней работы предлагают еще одно объяснение снижения жизнеспособности гибридов: несовместимость отдельных элементов генома, по их мнению, вызвана реактивацией транспозонов.

Следует отметить, что стремительное развитие молекулярно-генетических методов и подходов к анализу работы генома в ходе становления адаптивной радиации и формирования репродуктивной изоляции постоянно дополняет и заставляет корректировать полученные ранее данные. Так, исследования, выполненные с применением **AFLP-маркеров** при **картировании генома**, не выявили параллелизмов в дифференциации геномных участков у симпатричных пар сига североамериканских озер. На этом основании был сделан вывод, что у одной и той же экологической формы сига из разных водоемов на уровне генома параллелизмов меньше, чем на уровне внешней морфологии и физиологии (Gagnaire et al., 2013(b)).

Однако дальнейшие работы по картированию локусов количественных признаков (QTL) с применением более чувствительного метода, RAD-секвенирования, в комплексе с методами геометрической морфометрии позволили выделить группы однонуклеотидных замен, в комплексной изменчивости которых была обнаружена определенная тенденция для трех симпатричных пар сигов из пяти исследованных. Полученные результаты, таким образом, подтверждают с одной стороны, существование генетического параллелизма между формами, обитающими в сходных экологических условиях и/или занимающих одинаковые экологические ниши, а с другой — свидетельствуют о возможности вариативных генетических путей в формировании фенотипа (Laporte et al., 2015).

Необходимо иметь в виду, что все результаты, обсуждаемые выше, получены в ходе ис-

следования популяций сигов, многие черты генетического полиморфизма которых сформировались в условиях аллопатрии, и затем в результате вторичного контакта и симпатричного формообразования были усилены. Иные данные могут быть получены при рассмотрении симпатричных форм, возникших в водоеме без предшествующей стадии аллопатрии, что характерно для сиговых Европы (Bernatchez et al., 2010).

На данный момент четких представлений о механизмах формирования разнообразия сигов многих европейских водоемов нет. Наибольшее затруднение у исследователей вызывает тот факт, что использование ядерных и митохондриальных ДНК-маркеров дает разную информацию о филогенетических взаимоотношениях морфо-экологических форм. Так, ДНК-маркеры могут свидетельствовать о монофилетичности симпатричных форм, в то время как использование мультилокусных ядерных маркеров — о полифилетичном их происхождении, и наоборот (Schulz et al., 2006; Hansen et al., 1999). Наблюдаемый феномен исследователи пытаются объяснить гибридным происхождением (в том числе и в результате интрогрессивной гибридизации) большинства европейских популяций сиговых. В целом, однако, выводы о механизмах, лежащих в основе адаптивной радиации этой группы в водоемах Европы предварительны (Bernatchez et al., 2010).

Первые работы по исследованию транскриптомов и экспрессии генов у симпатричных европейских форм подтверждают результаты работ, выполненных для сигов Северной Америки. Так, показано, что количество транскриптов гемоглобина в мозге и жабрах сигов, нагуливающихся в разных участках водоема (профундаль, литораль, глубоководная часть озера) коррелирует с определенными однонуклеотидными заменами (SNP) в первом интроне гена альфа-цепи гемоглобина (Evans et al., 2014). В ходе анализа генетического полиморфизма симпатричных форм сига из субальпийских озер Швеции показано, что формообразование сопровождается увеличением генетической дивергенции между экотипами, что ведет в дальнейшем к развитию репродуктивной изоляции между ними (Ingram et al., 2012).

Подводя итог, можно сказать, что целый ряд методов активно используется в настоящее время для исследования механизмов становления генетического разнообразия, формирования адаптаций и репродуктивной изоляции на уровне форм, популяций, видов сиговых. Существенно пролить свет на генетические аспекты дивергенции форм, и, далее, эволюционного процесса, в случае организмов, не являющихся

классическими, “модельными” в подобных исследованиях помогает лишь комплексное использование разных методических подходов в рамках определенной концепции. Предполагается, что исследование изменчивости на уровне ДНК, экспрессии генов в комплексе с изучением фенотипической изменчивости дополнит понимание процесса видообразования сиговых рыб (Bernatchez et al., 2010; Hebert et al., 2013). Вместе с тем, многие полученные на данный момент результаты требуют дальнейшего кропотливого анализа и осмысления. Отметим, что кроме теоретической значимости, молекулярно-генетические исследования сиговых имеют и практическое применение: в рамках так называемой природоохранной генетики (“conservation genetics”) учеными предлагаются меры сохранения разнообразия естественных популяций группы, даются рекомендации по мониторингу, управлению их ресурсами (Douglas, Brunner, 2002; Kohlmann et al., 2007; Säisä et al., 2008; Mee et al., 2015 и др.).

Несколько слов необходимо сказать о состоянии исследований сиговых рыб с использованием молекулярно-генетических методов в России, поскольку водоемы нашей страны — местообитание целого ряда видов и форм семейства, в том числе эндемичных и реликтовых. Работы последних лет посвящены, главным образом, характеристике внутривидового генетического разнообразия, внутри- и межвидовым филогенетическим взаимоотношениям и проблемам филогеографии (Сендек и др., 2010; Bochkarev et al., 2011, 2013; Sendek, 2012; Sukhanova et al., 2012; Borovikova et al., 2013 и др.). Следует отметить крупную обзорную работу, посвященную результатам селекционно-генетических исследований пеляди *C. peled* (Андрияшева, 2011). Основными генетическими маркерами в работах российских ихтиологов являются белки-ферменты (Сендек и др., 2010; Sendek et al., 2012), фрагменты мтДНК (Bochkarev et al., 2011, 2013; Borovikova et al., 2013), и реже — участки ядерного генома, как правило, ITS (Sukhanova et al., 2004). Чаще всего применяются такие методы анализа полиморфизма как аллозимный анализ, ПЦР-ПДРФ анализ и определение нуклеотидной последовательности ДНК. Интересно, что нет ни одной публикации, где в качестве маркеров используются микросателлитные локусы.

Как правило, работы российских ихтиологов посвящены фауне сиговых определенных регионов, крупномасштабные филогеографические и филогенетические исследования отсутствуют. Так, например, изучен генетический полиморфизм эндемичных популяций сиговых

рыб оз. Баунт (Bochkarev et al., 2013), верховьев рек Обь и Енисей (Bochkarev et al., 2011), сиговых из водоемов бассейнов Белого и Балтийского морей (Сендек и др., 2010; Sendek, 2012; Voronikova et al., 2013), водоемов субарктической зоны России (Sendek et al., 2013). Одним из важных выводов, полученных в ходе этих работ, является указание на существование в районе Восточно-Европейской равнины крупного приледникового рефугиума, где могли обособиться специфические филогенетические линии сига и ряпушки, происходил контакт сибирской и европейской фаун сиговых (Сендек и др., 2010; Боровикова, Махров, 2012).

Важным результатом является доказательство филогенетической близости байкальского омуля *C. autumnalis migratorius* комплексу сигов оз. Байкал, а не арктическому омулю *C. autumnalis* (Sukhanova et al., 2002, 2004). Интерес представляют данные о присутствии разных филогенетических линий сига в оз. Баунт (Bochkarev et al., 2013). В целом, однако, проблемы филогеографии и филогении сиговых рыб нашей страны остаются недостаточно полно изученными, подавляющая часть популяций, форм, видов, в том числе и уникальных, остаются не охваченными молекулярно-генетическими исследованиями.

#### ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И МАРКЕРОВ В ИССЛЕДОВАНИЯХ СИГОВЫХ РЫБ

Выше, при обсуждении тех или иных молекулярно-генетических методов и маркеров уже упоминался ряд их преимуществ и недостатков, поэтому здесь остановимся на некоторых из них. Так, необходимо иметь в виду, что применение мтДНК как маркера при изучении филогеографии будет затруднено, если в процессе видообразования имела место интрогрессивная гибридизация. В этом случае гаплотипы, которые сохранились в популяции после интрогрессии, могут по прошествии времени не проявлять никакой географической ассоциации с популяцией (формой), от которой они произошли. Отличить при этом полифилию вследствие интрогрессии от неполного расхождения линий и сохранения предкового полиморфизма будет сложно, особенно в случае, когда гаплотипы распространившись и находясь далеко за пределами зоны симпатрии участвовавших в гибридизации популяций (форм), накопят значительное количество отличий от гаплотипов предковой линии (Абрамсон, 2009).

Для контрольного региона мтДНК показано существование инсерционно-делеционного полиморфизма, то есть полиморфизма, возни-

кающего за счет вставок и делеций, в результате чего варьирует длина всего фрагмента (Brzuzan, 2000). При этом, как оказалось в случае сиговых рыб, вставки одного и того же размера могут иметь разные нуклеотидные последовательности (Боровикова др., неопубл. данные), что следует учитывать при использовании этого маркера в филогеографических и филогенетических работах. Отметим, что инсерционно-делеционный полиморфизм типичен и для ряда участков ядерной ДНК (например, ITS-регионы рДНК) (Sukhanova et al., 2004).

При изучении процессов расселения с использованием мтДНК следует иметь в виду возможность селективной значимости отдельных гаплотипов: так, для родственного сиговым атлантического лосося (*Salmo salar*) показано, что некоторые участки мтДНК могут действительно находиться под действием отбора (Артамонова, Махров, 2015). Как отмечалось выше, под действием отбора могут находиться и микросателлитные локусы (обзор: Artamonova, 2007(b); Артамонова, Махров, 2015).

В разных работах приводятся противоречивые сведения о сопоставимости друг с другом результатов анализа полиморфизма мтДНК и микросателлитов для одной и той же популяции. Одни авторы отмечают противоречия в результатах анализа полиморфизма популяций с использованием этих маркеров (Hansen et al., 1999), другие подобных противоречий не обнаруживают (Schulz et al., 2006). Очевидно, это связано с различиями относительной скорости эволюции разных геномных регионов. Так, например, даже в пределах митогенома одни его участки накапливают нуклеотидные замены быстрее, чем другие: наибольшая скорость эволюции характерна для генов НАДН-дегидрогеназного комплекса (*ND*), цитохрома б (*cyt b*) и контрольной области, причем гены *ND1* и *ND2* эволюционируют быстрее, чем контрольный регион. Гены цитохром оксидазы (*COX*) и тРНК имеют скорость эволюции в 2–3 раза меньше, чем *ND* гены; самые медленно эволюционирующие — рибосомальные гены и гены АТФ (Jacobsen et al., 2016).

Разная скорость накопления мутаций может быть связана с положением генов в молекуле мтДНК. Так, например, гены цитохрома б и НАДН-дегидрогеназного комплекса расположены вблизи точек начала репликации легкой и тяжелой цепей мтДНК. Именно эти участки в ходе репликации мтДНК остаются в одонитивом состоянии дольше остальных, что делает их более уязвимыми к действию мутагенов, присутствующих в матриксе митохондрий (Marshall et al., 2009). Имея в виду приведенные

выше факты, для получения адекватного представления о генетической структуре популяций, филогеографии, филогении той или иной группы рыб необходимо использовать несколько молекулярно-генетических маркеров.

Критически следует подходить и к результатам, получаемым с помощью методов секвенирования нового поколения (Next-Generation Sequencing, NGS). Подобные работы должны учитывать частичную тетраплоидность ядерного генома сиговых, и усложняются отсутствием референсных последовательностей для большинства его участков, которые можно было бы использовать при картировании на хромосомах обнаруженных нуклеотидных замен. При анализе работ с использованием данных NGS рекомендуется обращать внимание на степень покрытия друг другом секвенированных последовательностей: низкая степень покрытия может привести к ложному завышению уровня гомозиготности, а использование при анализе транскриптома низких пороговых значений показателей, по которым осуществляется поиск однонуклеотидных замен, ведет к завышению оценок полиморфизма (Renaut et al., 2010; Hebert et al., 2013).

Недостатком RAD-секвенирования является приуроченность его к сайтам рестрикции,

что не позволяет выбрать наиболее интересный с точки зрения исследователя регион генома. Отсутствие специфичных для сиговых матриц-мишеней для проведения ДНК-гибридизации в ходе исследования экспрессии генов является причиной использования ДНК-микрочипов, разработанных для других групп лососевидных рыб. Использование подобных низко- и неспецифичных мишеней при гибридизации приводит к снижению доли прочтенных последовательностей даже при высоком числе охваченных в исследовании генов. Повышает риск неправильных прочтений и применение в качестве мишеней матрицы кДНК (Hebert et al., 2013).

В целом, несмотря на указанные “минусы” молекулярно-генетические методы и маркеры, несомненно, могут успешно применяться в решении широкого спектра проблем таксономии, филогении, филогеографии сиговых рыб, разработке теоретических основ, касающихся понимания механизмов видообразования, оценке современного состояния и динамики генетического разнообразия популяций и видов с целью создания систем мониторинга и управления их ресурсами. Залог этого — корректная постановка проблемы исследования и соответствующий выбор методов и маркеров с учетом их достоинств и недостатков.

**Благодарность.** Автор искренне признателен рецензенту за ценные советы и полезные замечания, позволившие значительно улучшить данную работу. Подготовка публикации поддержана грантом РФФИ №16-14-10001.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамсон Н.И. Молекулярные маркеры, филогеография и поиск критерия разграничения видов // Труды зоологич. Института РАН. 2009. Прил. № 1. С. 185–198. Abramson N.I. Molekulyarnye markery, filogeografiya i poisk kriteriya razgranicheniya vidov // Trudy zoologich. Instituta RAN. 2009. Pril. № 1. S. 185–198. [Abramson N.I. Molecular markers, phylogeography and search for the criteria for delimiting species // Proceedings of Zoological Institute of RAS. 2009. Suppl. № 1. P. 185–198.] In Russian with English abstract
- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях (3-е перераб. и дополн. изд.). М.: ИКЦ Академкнига, 2003. 431 с. [Altukhov Yu.P. Intraspecific Genetic Diversity. Monitoring, Conservation and Management. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2006. 438 p.]
- Андрияшева М.А. Генетические аспекты разведения сиговых рыб. СПб.: Типография “Феникс”, 2011. 640 с. Andriyashcheva M.A. Geneticheskie aspekty razvedeniya sigovykh ryb. SPb.: Tipografiya “Feniks”, 2011. 640 s. [Andriyashcheva M.A. Genetic aspects of coregonid fishes breeding. St.-Petersburg: “Pheniks”, 2011. 640 p.] In Russian
- Артамонова В.С., Махров А.А. Генетические методы в лососеводстве и форелеводстве: от традиционной селекции до нанобиотехнологий. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2015. 128 с. Artamonova V.S., Makhrov A.A. Geneticheskie metody v lososevodstve i forelevodstve: ot traditsionnoy seleksii do nanobiotekhnologiy. M.: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK. 2015. 128 s. [Artamonova V.S., Makhrov A.A. Genetic methods in Salmon and Trout breeding: from traditional selection to nanobiotechnologies. Moscow: KMK Scientific Press. 2015. 128 p.] In Russian with English abstract
- Боровикова Е.А., Махров А.А. Систематическое положение и происхождение сигов Европы. Генетический подход // Успехи современной биологии. 2009. Т. 129. № 1. С. 58–66. Borovikova E.A., Makhrov A.A. Sistematicheskoe polozhenie i proiskhozhdenie sigov Evropy. Geneticheskiy podkhod // Uspekhi sovremennoy biologii. T. 129. № 1. S. 58–66. [Borovikova E.A., Makhrov A.A. Taxonomy and origin of whitefish and ciscoes (*Coregonus*) in Europe. The genetic approach // Biology Bulletin Review. 2009. Vol. 129. № 1. P. 58–66.] In Russian
- Боровикова Е.А., Махров А.А. Изучение популяций переходной зоны между европейской и сибирской ряпушками (*Coregonus*): роль среды обитания в видообразовании // Принципы экологии. 2012. Т. 1. № 4. С. 5–20. Borovikova E.A., Makhrov A.A. Izuchenie populyatsiy perekhodnoy zony mezhdru evropeyskoy i sibirskoy

- ryapushkami (*Coregonus*): rol' sredy obitaniya v vidoobrazovanii // Printsipy ekologii. 2012. T. 1. № 4. S. 5–20. [Borovikova E.A., Makhrov A.A. Study of coregonus populations in the zone of intergradation between the vendace and least cisco: the role of the environment in speciation // Principles of Ecology. 2012. Vol. 1. № 4. P. 5–20.] In Russian with English abstract. <http://ecopri.ru>
- Боровикова Е.А., Махров А.А. Систематическое положение и происхождение сигов Европы: Морфоэкологический подход // Труды Карельского научного центра РАН. 2013. № 6. Серия Экологические исследования. С. 105–115. Borovikova E.A., Makhrov A.A. Sistematischeskoe polozhenie i proiskhozhdenie sigov Evropy: Morfoekologicheskii podkhod // Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN. 2013. № 6. Seriya Ekologicheskie issledovaniya. S. 105–115. [Borovikova E.A., Makhrov A.A. Taxonomy and origin of whitefish and ciscoes (*Coregonus*) in Europe: a morphoecological approach // Transactions of Karelian Research Centre of Russian Academy of Science. 2013. № 6. P. 105–115.] In Russian with English abstract
- Локшина А.Б. Сравнительный электрофоретический анализ некоторых белков сиговых рыб // Сборник научн. трудов ГосНИОРХ. 1980. Вып. 153. С. 46–57. Lokshina A.B. Sravnitel'nyy elektroforeticheskiy analiz nekotorykh belkov sigovykh ryb // Sbornik nauchn. trudov GosNIORKh. 1980. Вып. 153. С. 46–57. [Lokshina A.B. Comparative electrophoretic analysis of some proteins of the whitefish // Collected articles of the State Research Institute of the Lakes and Rivers Fish Industry. 1980. Iss. 153. P. 46–57.] In Russian with English abstract
- Попов И.Ю., Сендек Д.С. Квинтэссенция эволюции // Эволюционная биология: история и теория. 2003. Вып. 2. СПб: СПбФИИЕТ РАН. С. 172–189. Popov I.Yu., Sendek D.S. Kvintessentsiya evolyutsii // Evolyutsionnaya biologiya: istoriya i teoriya. 2003. Вып. 2. SPb: SPbFIIET RAN. S. 172–189. [Popov I.Yu., Sendek D.S. Quintessence of evolution // Evolutional biology: history and theory. 2003. Iss. 2. Sankt-Petersburg: St. Petersburg Branch of the Institute of History of Science and Technology RAS. P. 172–189.] In Russian with English abstract
- Решетников Ю.С. Современные проблемы изучения сиговых рыб // Вопросы ихтиологии. 1995. Т. 35. № 2. С. 156–174. Reshetnikov Yu.S. Sovremennyye problemy izucheniya sigovykh ryb // Voprosy ikhtiologii. 1995. T. 35. № 2. S. 156–174. [Reshetnikov Yu.S. The current problems of coregonid fishes // Journal of Ichthyology. 1995. Vol. 35. № 2. P. 156–174.] In Russian
- Решетников Ю.С. О центрах возникновения и центрах расселения в связи с распределением числа видов по ареалу на примере сиговых рыб / Актуальные проблемы современной ихтиологии (к 100-летию Г.В. Никольского). Сборник статей. М.: Т-во научных изданий КМК, 2010. С. 62–87. Reshetnikov Yu.S. O tsentrakh vozniknoveniya i tsentrakh rasseleniya v svyazi s raspredeleniem chisla vidov po arealu na primere sigovykh ryb / Aktual'nye problemy sovremennoy ikhtiologii (k 100-letiyu G.V. Nikol'skogo). Sbornik statey. M.: T-vo nauchnykh izdaniy KMK, 2010. S. 62–87. [About centers of origin and centers of spreading in connection with the distribution of the number of species on areas (on the example of whitefish) / Actual problems of modern ichthyology (the 100th anniversary of Nikol'sky G.V.). Digest of articles. Publishing House KMK, Moscow. 2010. P. 62–87.] In Russian
- Сендек Д.С., Новоселов А.П., Студенов И.И. Связана ли история становления популяций ряпушек восточного берега Белого моря с постледниковой гибридизацией европейской ряпушки (*Coregonus albula*) и сибирской ряпушки (*Coregonus sardinella*)? // Биология, биотехника разведения и состояние запасов сиговых рыб. Материалы седьмого международного научно-производственного совещания. Тюмень: ФГУП Госрыбцентр, 2010. С. 59–64. Sendek D.S. Novoselov A.P., Studenov I.I. Svyazana li istoriya stanovleniya populyatsiy ryapushkek vostochnogo berega Belogo moray s postlednikovoy gibridizatsiey evropeyskoy ryapushki (*Coregonus albula*) i sibirskoy ryapushki (*Coregonus sardinella*)? // Biologiya, biotekhnika razvedeniya i sostoyanie zapasov sigovykh ryb. Materialy sed'mogo mezhdunarodnogo nauchno-tekhnicheskogo soveshchaniya. Tyumen': FGUP Gosrybtsentr, 2010. S. 59–64. [Sendek D.S. Novoselov A.P., Studenov I.I. Whether the history of becoming of cisco populations of east coast of the White Sea is connected with postglacial hybridization of European cisco (*Coregonus albula*) and least cisco (*Coregonus sardinella*)? // Biology, biotechnology of breeding and condition of whitefish stocks: Proceedings of VII-th International Scientific and Practical workshop. Tumen, 2010 P. 59–64.] In Russian
- Слободянюк С.Я., Кирильчик С.В., Мамонтов А.М., Скулин В.А. Сравнительный рестрикционный анализ митохондриальной ДНК байкальского *Coregonus lavaretus baicalensis* и баунтовского *C. lavaretus baunti* озерных сигов // Вопросы ихтиологии. 1993. Т. 33. № 5. С. 631–636. Slobodyanyuk S.Ya., Kiril'chik S.V., Mamontov A.M., Skulin V.A. Sravnitel'nyy restriksionnyy analiz mitokhondrial'noy DNK baykal'skogo *Coregonus lavaretus baicalensis* i bauntovskogo *C. lavaretus baunti* ozernykh sigov // Voprosy ikhtiologii. 1993. T. 33. № 5. S. 631–636. [Slobodyanyuk S.Ya., Kiril'chik S.V., Mamontov A.M., Skulin V.A. Comparative mitochondrial DNA restriction analysis of *Coregonus lavaretus baicalensis* (Lake Baikal) and *C. lavaretus baunti* (Lake Baunt) // Journal of Ichthyology. 1993. Vol. 33. № 5. P. 631–636.] In Russian
- Abdul-Muneer P.M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies // Genetic Research International. Hindawi Publishing Corporation, 2014. Vol. 2014. Article ID 691759. 11 p. (doi: 10.1155/2014/691759)
- Artamonova V.S. Genetic markers in population studies of Atlantic salmon *Salmo salar* L.: Karyotype characters and allozymes // Russian Journal of Genetics. 2007(a). Vol. 43. № 3. P. 221–233. (doi: 10.1134/S1022795407030015)
- Artamonova V.S. Genetic markers in population studies of Atlantic salmon *Salmo salar* L.: Analysis of DNA sequences // Russian Journal of Genetics. 2007(b). Vol. 43. № 4. P. 341–353. (doi: 10.1134/S1022795407040011)

- Avise J.C. Molecular markers, natural history and evolution. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2004. 684 p.
- Bernatchez L., Colombani F., Dodson J.J. Phylogenetic relationships among the subfamily Coregoninae as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis // J. Fish Biol. 1991. Vol. 39. (Suppl. A). P. 283–290. (doi: 10.1111/j.1095-8649.1991.tb05091.x)
- Bernatchez L., Dodson J.J. Phylogeographic structure in mitochondrial DNA of the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and its relation to Pleistocene glaciations // Evolution. 1991. Vol. 45. № 4. P. 1016–1035. (doi: 10.2307/2409706)
- Bernatchez L., Dodson J.J. Phylogenetic relationships among Palearctic and Nearctic whitefish (*Coregonus* sp.) populations as revealed by mitochondrial DNA variation // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1994. Vol. 51 (Suppl. 1). P. 240–251. (doi: 10.1139/f94-310)
- Bernatchez L., Renault S., Whiteley A.R., Derome N., Jeukens J., Landry L., Lu G., Nolte A.W., Østbye K., Rogers S.M., St-Cyr J. On the origin of species: insights from the ecological genomics of lake whitefish // Phil. Trans. R. Soc. B. 2010. Vol. 365. P. 1783–1800. (doi: 10.1098/rstb.2009.0274)
- Bernatchez L., Savard L., Dodson J.J., Pallotta D. Mitochondrial DNA sequence heterogeneity among James-Hudson Bay anadromous coregonines // Finn. Fish. Res. 1988. Vol. 9. P. 17–26.
- Bernatchez L., Renault S., Whiteley A.R., Derome N., Jeukens J., Landry L., Lu G., Nolte A.W., Østbye K., Rogers S.M., St-Cyr J. On the origin of species: insights from the ecological genomics of lake whitefish // Phil. Trans. R. Soc. B. 2010. Vol. 365. P. 1783–1800. (doi: 10.1098/rstb.2009.0274)
- Bodaly R.A., Clayton J.W., Lindsey C.C., Vuorinen J. Evolution of the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) in North America during the Pleistocene: genetic differentiation between sympatric populations // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1992. Vol. 49. № 4. P. 769–779. (doi: 10.1139/f92-086)
- Bochkarev N.A., Zuykova E.I., Abramov S.A., Katokhin A.V., Matveev A.A., Samusenok V.P., Baldina S.N., Gordon N.Yu., Politov D.V. Morphological, ecological and mtDNA sequence variation in coregonid fish from Baunt Lake system (the Vitim River basin) // Advanc. Limnol. 2013. Vol. 64. P. 257–277. (doi: 10.1127/1612-166X/2013/0064-0025)
- 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. Vol. 25. P. 557–572. (doi: 10.1007/s10682-010-9437-7)
- Bodaly R.A., Vuorinen J., Ward R.D., Luczynski M., Reist J.D. Genetic comparisons of New and Old World coregonid fishes // J. Fish Biol. 1991. Vol. 38. № 1. P. 37–51. (doi: 10.1111/j.1095-8649.1991.tb03089.x)
- Borovikova E.A., Alekseeva Ya.I., Schreider M.J., Artamonova V.S., Makhrov A.A. Morphology and genetics of the ciscoes vendace (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae: Coregoninae: *Coregonus albula*) from the Solovetsky Archipelago (White Sea) as a key to determination of the taxonomic position of ciscoes in Northeastern Europe // Acta Ichth. Pisc. 2013. Vol. 43. № 3. P. 183–194. (doi: 10.3750/AIP2013.43.3.02)
- Brzuzan P. Tandemly repeated sequences in mtDNA control region of whitefish, *Coregonus lavaretus* // Genome. 2000. Vol. 43. № 3. P. 584–587. (doi: 10.1139/g00-001)
- Brzuzan P., Kozłowski J., Fopp D. Genetic structure of Polish populations of vendace (*Coregonus albula* L.) inferred from mitochondrial DNA // Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. 2002. Vol. 57. P. 1–10.
- Campbell D., Bernatchez L. Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes // Mol. Biol. Evol. 2004. Vol. 21. № 5. P. 945–956. (doi: 10.1093/molbev/msh101)
- Chellevald J.R. The genetic relationships of intergeneric and intergeographical coregonids as determined by protein properties / Biology of Coregonid Fishes (Lindsey C.C., Woods C.S., eds.). Winnipeg: University of Manitoba Press. 1970. P. 115–126.
- Chouinard A., Bernatchez L. A study of trophic niche partitioning between larval populations of reproductively isolated whitefish (*Coregonus* sp.) ecotypes // J. Fish Biol. 1998. Vol. 53. № 6. P. 1231–1242. (doi: 10.1111/j.1095-8649.1998.tb00244.x)
- Clayton J.W., Franzin W.G. Genetics of multiple lactate dehydrogenase isozymes in muscle tissue of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) // J. Fish. Res. Board Can. 1970. Vol. 27. № 6. P. 1115–1121. (doi: 10.1139/f70-127)
- Dass J.F.P., Sudandiradoss C. Insight into pattern of codon biasness and nucleotide base usage in serotonin receptor gene family from different mammalian species // Gene. 2012. Vol. 503. № 1. P. 92–100. (doi: 10.1016/j.gene.2012.03.057)
- Delling B., Palm S., Palkopoulou E., Prestegard T. Genetic signs of multiple colonization events in Baltic ciscoes with radiation into sympatric spring- and autumn-spawners confined to early postglacial arrival // Ecol. and Evol. 2014. Vol. 4. № 22. P. 4346–4360. (doi: 10.1002/ece3.1299)
- Derome N., Bougas B., Rogers S.M., Whiteley A.R., Labbe A., Laroche J., Bernatchez L. Pervasive sex-linked effects on transcription regulation as revealed by expression Quantitative Trait Loci mapping in lake whitefish species pairs (*Coregonus* sp., Salmonidae) // Genetics. 2008. Vol. 179. P. 1903–1917. (doi: 10.1534/genetics.107.086306)

- Derome N., Duchesne P., Bernatchez L. Parallelism in gene transcription among sympatric lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis* Mitchell) // Mol. Ecol. 2006. Vol. 15. № 5. P. 1239–1250. (doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02968.x)
- Dion-Côté A.-M., Renaut S., Normandeau E., Bernatchez L. RNA-seq reveals transcriptomic shock involving transposable elements reactivation in hybrids of young lake whitefish species // Mol. Biol. Evol. 2014. Vol. 31. № 5. P. 1188–1199. (doi: 10.1093/molbev/msu069)
- Douglas M.R., Brunner P.C. Biodiversity of Central Alpine *Coregonus* (Salmoniformes): impact of one-hundred years of management // Ecol. Applic. 2002. Vol. 12. № 1. P. 154–172.
- Douglas M.R., Brunner P.C., Bernatchez L. Do assemblages of *Coregonus* (Teleostei: Salmoniformes) in the Central Alpine region of Europe represent species flocks? // Mol. Ecol. 1999. Vol. 8. P. 589–603. (doi: 10.1046/j.1365-294x.1999.00581.x)
- Douglas M.R., Brunner P.C., Douglas M.E. Evolutionary homoplasy among species flocks of Central Alpine *Coregonus* (Teleostei: Salmoniformes) // Copeia. 2005. Vol. 2. P. 347–358. (doi: 10.1643/CG-04-128R)
- Ermolenko L.N. Genetic divergence in the family Coregonidae // Pol. Arch. Hydrobiol. 1992. Vol. 39. № 3–4. P. 533–539.
- Evans M.L., Bernatchez L. Oxidative phosphorylation gene transcription in whitefish species pairs reveals patterns of parallel and nonparallel physiological divergence // J. Evol. Biol. 2012. Vol. 25. P. 1823–1834. (doi: 10.1111/j.1420-9101.2012.02570.x)
- Evans M.L., Præbel K., Peruzzi S., Amundsen P.-A., Bernatchez L. Phenotype-environment association of the oxygen transport system in trimorphic European whitefish (*Coregonus lavaretus*) populations // Evolution. 2014. Vol. 68. № 8. P. 2197–2210. (doi: 10.1111/evo.12442)
- Ferguson A., Himberg K.-J. M., Svårdson G. Systematic of the Irish pollan (*Coregonus pollan* Thompson): an electrophoretic comparison with other Holarctic Coregoninae // J. Fish Biol. 1978. Vol. 12. P. 221–233. (doi: 10.1111/j.1095-8649.1978.tb04168.x)
- Filteau M., Pavey S.A., St-Cyr J., Bernatchez L. Gene coexpression networks reveal key drivers of phenotypic divergence in lake whitefish // Mol. Biol. Evol. 2013. Vol. 30. № 6. P. 1384–1396. (doi: 10.1093/molbev/mst053)
- Finger A., Klank C. Review: Molecular methods: blessing or curse? / Relict Species: Phylogeography and conservation biology. (eds. Habel J.C., Assmann T.). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. P. 309–320.
- Gagnaire P.-A., Normandeau E., Pavey S.A., Bernatchez L. Mapping phenotypic, expression and transmission ratio distortion QTL using RAD markers in the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) // Mol. Ecol. 2013(a). Vol. 22. P. 3036–3048. (doi: 10.1111/mec.12127)
- Gagnaire P.-A., Pavey S.A., Normandeau E., Bernatchez L. The genetic architecture of reproductive isolation during speciation-with-gene-flow in lake whitefish species pairs assessed by RAD sequencing // Evolution. 2013(b). Vol. 67. № 9. P. 2483–2497. (doi: 10.1111/evo.12075)
- Gonzales-Villasenor L.I., Burkhoff A.M., Corces V., Powers D.A. Characterization of cloned mitochondrial DNA from the teleost *Fundulus heteroclitus* and its usefulness as an interspecies hybridization probe // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1986. Vol. 43. P. 1866–1872. (doi: 10.1139/f86-231)
- Gum B., Geist J., Eckenfels S., Brinker A. Genetic diversity of upper Lake Constance whitefish *Coregonus* spp. under the influence of fisheries: a DNA study based on archived scale samples from 1932, 1975 and 2006 // J. Fish Biol. 2014. Vol. 84. № 6. P. 1721–1739. (doi: 10.1111/jfb.12393)
- Hamada M., Himberg M., Bodaly R.A., Reist J.D., Okada N. Monophyletic origin of the genera *Stenodus* and *Coregonus* as inferred from analysis of the insertion of SINES (short interspersed repetitive elements) // Advanc. Limnol. 1998. Vol. 50. P. 383–389.
- Hansen M.M., Fraser D.J., Als T.D., Mensberg K.-L.D. Reproductive isolation, evolutionary distinctiveness and setting conservation priorities: The case of European lake whitefish and the endangered North Sea houting (*Coregonus* spp.) // BMC Evol. Biol. 2008. Vol. 8. P. 137–153. (doi: 10.1186/1471-2148-8-1337)
- Hansen M.M., Mensberg K.-L.D., Berg S. Postglacial recolonization patterns and genetic relationships among whitefish (*Coregonus* sp.) populations in Denmark, inferred from mitochondrial DNA and microsatellite markers // Mol. Ecol. 1999. Vol. 8. P. 239–252. (doi: 10.1046/j.1365-294X.1999.00557.x)
- Hebert F.O., Renaut S., Bernatchez L. Targeted sequence capture and resequencing implies a predominant role of regulatory regions in the divergence of a sympatric lake whitefish species pair (*Coregonus clupeaformis*) // Mol. Ecol. 2013. Vol. 22. P. 4896–4914. (doi: 10.1111/mec.12447)
- Hirsch P.E., Eckmann R., Oppelt C., Behrmann-Godel J. Phenotypic and genetic divergence within a single whitefish form — detecting the potential for future divergence // Evol. Appl. 2013. Vol. 6. № 8. P. 1119–1132. (doi: 10.1111/eva.12087)
- Hudson A.G., Vonlanthen P., Müller R., Seehausen O. Review: The geography of speciation and adaptive radiation in coregonines // Advanc. Limnol. 2007. Vol. 60. P. 111–146.
- Hudson A.G., Vonlanthen P., Seehausen O. Rapid parallel radiation from a single hybridogenic ancestral population // Proc. R. Soc. B. 2011. Vol. 278. № 1702. P. 58–66. (doi: 10.1098/rspb.2010.0925)
- Ingram T., Hudson A.G., Vonlanthen P., Seehausen O. Does water depth or diet divergence predict progress toward ecological speciation in whitefish radiations? // Evol. Ecol. Res. 2012. Vol. 14. P. 487–502.

- Jacobsen M.W., da Fonseca R.R., Bernatchez L., Hansen M.M. Comparative analysis of complete mitochondrial genomes suggests that relaxed purifying selection is driving high nonsynonymous evolutionary rate of the NADH2 gene in whitefish (*Coregonus* spp.) // Mol. Phil. Evol. 2016. Vol. 95. P. 161–170. (doi: 10.1016/j.ympev.2015.11.008)
- Jacobsen M.W., Hansen M.M., Orlando L., Bekkevold D., Bernatchez L., Willerslev E., Gilbert M.T.P. Mitogenome sequencing reveals shallow evolutionary histories and recent divergent time between morphologically and ecologically distinct European whitefish (*Coregonus* spp.) // Mol. Ecol. 2012. Vol. 21. P. 2727–2742. (doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05561.x)
- Jeukens J., Bernatchez L. Regulatory versus coding signatures of natural selection in a candidate gene involved in the adaptive divergence of whitefish species pairs (*Coregonus* spp.) // Ecol. Evol. 2012. Vol. 2. № 1. P. 258–271. (doi: 10.1002/ece3.52)
- Jeukens J., Bittner D., Knudsen R., Bernatchez L. Candidate genes and adaptive radiation: insights from transcriptional adaptation to the limnetic niche among Coregonine fishes (*Coregonus* spp., *Salmonidae*) // Mol. Biol. Evol. 2009. Vol. 26. № 1. P. 155–166. (doi: 10.1093/molbev/msn235)
- Jones F.C., Grabherr M.G., Chan Y.F. et al. The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks. Nature. 2012. Vol. 484. P. 55–61. (doi: 10.1038/nature10944)
- Jones C.S., Tegelstrom H., Latchman D.S., Berry R.J. An improved rapid method for mitochondrial DNA isolation suitable for use in the study of closely related populations // Biochem. Genet. 1988. Vol. 26. P. 83–88. (doi: 10.1007/BF00555490)
- Kempton J., Kohlmann K., Panicz R., Sadowski J., Keszka S. Genetic variability in European populations of *Coregonus lavaretus* (L.): an assessment based on mitochondrial *ND-1* gene haplotypes // Arch. Pol. Fish. 2010. Vol. 18. P. 197–204. (doi: 10.2478/v10086-010-0023-y)
- Kimchi-Sarfaty C., Oh J.M., Kim I.W., Calcagno A.M., Ambudkar S.V., Gottesman M.M. A “Silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity // Science. 2007. Vol. 315. № 5811. P. 525–528. (doi: 10.1126/science.1135308)
- Kirczuk L., Rymaszewska A., Czerniawski R., Pilecka-Rapacz M., Domagała J. Genetic structure of the cisco (*Coregonus albula* L.) from lakes of glacial origin in northern Poland // Open Life Sci. 2015. Vol. 10. P. 437–450. (doi: 10.1515/boil-2015-0046)
- Kohlmann K., Kempton J., Kersten P., Sadowski J. Haplotype variability at the mitochondrial ND-1 gene region of *Coregonus lavaretus* from Polish lakes // Advanc. Limnol. 2007. Vol. 60. P. 47–57.
- Krutovskii K.V., Vollmer S.S., Sorensen F.C., Adams W.T., Knapp S.J., Strauss S.H. RAPD genome map of Douglas-fir // J. Heredity. 1998. Vol. 89. № 3. P. 197–205. (doi: 10.1093/jhered/89.3.197)
- Laporte M., Rogers S.M., Dion-Côté A.-M., Normandeau E., Gagnaire P.-A., Dalziel A.C., Chebib J., Bernatchez L. RAD-QTL mapping reveals both genome-level parallelism and different genetic architecture underlying the evolution of body shape in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) species pairs // Genes. Gnomes. Genetics. 2015. Vol. 5. P. 1481–1491. (doi: 10.1534/g3.115.019067)
- Lindsey C.C. Stocks are Chameleons: plasticity in gill rakes of Coregonid fishes // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1981. Vol. 38. P. 1497–1506. (doi: 10.1139/f81-202)
- Lindsey C.C., Clayton J.W., Franzin W.C. Zoogeographic problems and protein variation in the *Coregonus clupeaformis* whitefish species complex / Biology of Coregonid Fishes (Lindsey C.C., Woods C.S., eds.). Winnipeg: University of Manitoba Press. 1970. P. 127–146.
- Lindsey C.C., Woods C.S. Preface / Biology of Coregonid Fishes. Lindsey C.C., Woods C.S. (eds.). Papers presented at the International Symposium on Biology of Coregonid Fishes held in Winnipeg, Canada, Aug. 25-29. 1969. Winnipeg: University of Manitoba press, 1970. P. I–II.
- Lu G., Bernatchez L. Correlated trophic specialization and genetic divergence in sympatric lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis*): support for the ecological speciation hypothesis // Evolution. 1999. Vol. 53. P. 1491–1505. (doi: 10.2307/2640895)
- Lu G., Basely D.J., Bernatchez L. Contrasting patterns of mitochondrial DNA and microsatellite introgressive hybridization between lineages of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*): relevance for speciation // Mol. Ecol. 2001. Vol. 10. P. 965–985. (doi: 10.1046/j.1365-294X.2001.01252.x)
- Luczynski M., Mamcarz A., Brzuzan P., Demska-Zakes K. Introgressive hybridization of the introduced peled (*Coregonus peled*) with native whitefish (*Coregonus lavaretus*) threatens indigenous Coregonid populations: a case study / Genetic in sustainable management of fish resources. Chapter 8. Fishing News Books, Blackwell Sci., Oxford, UK. 1999. P. 188–205.
- Marshall H.D., Coulson M.W., Carr S.M. Near neutrality, rate heterogeneity, and linkage govern mitochondrial genome evolution in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and other gadine fish // Mol. Biol. Evol. 2009. Vol. 26. № 3. P. 579–589. (doi: 10.1093/molbev/msn279)
- Mee J.A., Bernatchez L., Reist J.D., Rogers S.M., Taylor E.B. Identifying designatable units for intraspecific conservation prioritization: a hierarchical approach applied to the lake whitefish species complex (*Coregonus* spp.) // Evol. Applic. 2015. Vol. 8. № 5. P. 423–441. (doi: 10.1111/eva.12247)

- Mehner T., Pohlmann K., Elkin C., Monaghan M.T., Nitz B., Freyhof J. Genetic population structure of sympatric and allopatric populations of Baltic ciscoes (*Coregonus albula* complex, Teleostei, Coregonidae) // BMC Evol. Biol. 2010. Vol. 10. P. 85–98. (doi: 10.1186/1471-2148-10-85)
- Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. AFLP genotyping and fingerprinting // Trends Ecol. Evol. 1999. Vol. 14. № 10. P. 389–394. (doi: 10.1016/S0169-5347(99)01659-6)
- Nolte A.W., Renaut S., Bernatchez L. Divergence in gene regulation at young life history stages of whitefish (*Coregonus* sp.) and the emergence of genomic isolation // BMC Evol. Biol. 2009. Vol. 9. P. 59–70. (doi: 10.1186/1471-2148-9-59)
- Oreha J., Morozova A., Shkute N. Combined assessment of genetic variability of *Coregonus albula* (L.) populations in Latvia based on allozymes and RAPD markers // Biologija. 2013. Vol. 59. № 1. P. 15–28.
- Østbye K., Bernatchez L., Næsje T.F., Himberg M.K.-J., Hindar K. Evolutionary history of the European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) species complex as inferred from mtDNA phylogeography and gill-raker numbers // Mol. Ecology. 2005(a). Vol. 14. P. 4371–4387. (doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02737.x)
- Østbye K., Næsje T.F., Bernatchez L., Sandlund O.T., Hindar K. Morphological divergence and origin of sympatric populations of European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) in Lake Femund, Norway // J. Evol. Biol. 2005(b). Vol. 18. P. 683–702. (doi: 10.1111/j.1420-9101.2004.00844.x)
- Østbye K., Amundsen P.-A., Bernatchez L., Klementsén A., Knudsen R., Kristoffersen R., Næsje T.F., Hindar K. 2006. Parallel evolution of ecomorphological traits in the European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) species complex during postglacial times // Molecular Ecology. 2006. Vol. 15. № 13. P. 3983–4001. (doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03062.x)
- Palva T.K., Palva E.T. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction // FEBS Letters. 1985. Vol. 192. P. 267–270. (doi: 10.1016/0014-5793(85)80122-8)
- Partti-Pellinen K., Elo K., Palva T.K., Tuunainen P., Hakumäki M.O.K. Restriction fragment length polymorphism in mitochondrial DNA of stocks of *Coregonus* in Finland // Polski Arch. Hydrobiol. 1992. Vol. 39. № 3–4. P. 541–549.
- Reist J.D., Maiers L.D., Bodaly R.A., Vuorinen J.A., Carmichael T.J. The phylogeny of new- and old-world coregonine fishes as revealed by sequence variation in a portion of the d-loop of mitochondrial DNA // Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. 1998. Vol. 50. P. 323–339.
- Renaut S., Nolte A.W., Bernatchez L. Gene expression divergence and hybrid misexpression between lake whitefish species pairs (*Coregonus* spp. Salmonidae) // Mol. Biol. Evol. 2009. Vol. 26. № 4. P. 925–936. (doi: 10.1093/molbev/msp017)
- Perelygin A.A. Genetic variability of proteins in the populations of vendace (*Coregonus albula*) and least cisco (*Coregonus sardinella*). Nordic J. of Freshwater Res. 1992. Vol. 67. P. 99.
- Polotov 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. Vol. 57. (Suppl. A). P. 51–71. (doi: 10.1006/jfbi.2000.1608)
- Polotov D.V., Gordon N.Yu., Makhrov A.A. Genetic identification and taxonomic relationships of six Siberian species of *Coregonus* // Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol. 2002. Vol. 57. P. 21–34.
- Præbel K., Gjelland K.Ø., Salonen E., Amundsen P.-A. Invasion genetics of vendace (*Coregonus albula* (L.)) in the Inari-Pasvik watercourse: revealing the origin and expansion pattern of a rapid colonization event // Ecology and Evolution. 2013. Vol. 3. № 3. P. 1400–1412. (doi: 10.1002/ece3.552)
- Renaut S., Mailliet N., Normandeau E., Sauvage C., Derome N., Rogers S.M., Bernatchez L. Genome-wide patterns of divergence during speciation: the lake whitefish case study // Phil. Trans. R. Soc. B. 2012. Vol. 367. P. 354–363. (doi: 10.1098/rstb.2011.0197)
- Renaut S., Nolte A.W., Bernatchez L. Mining transcriptome sequences towards identifying adaptive single nucleotide polymorphisms in lake whitefish species pairs (*Coregonus* spp. Salmonidae) // Mol. Ecol. 2010. Vol. 19. (Suppl. 1). P. 115–131. (doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04477.x)
- Rogers S.M., Bernatchez L. The genetic basis of intrinsic and extrinsic postzygotic reproductive isolation jointly promoting speciation in the lake whitefish species complex (*Coregonus clupeaformis*) // J. Evol. Biol. 2006. Vol. 19. № 6. P. 1979–1994. (doi: 10.1111/j.1420-9101.2006.01150.x)
- Rogers S.M., Bernatchez L. The genetic architecture of ecological speciation and the association with signatures of selection in natural lake whitefish (*Coregonus* sp. Salmonidae) species pairs // Mol. Biol. Evol. 2007. Vol. 24. P. 1423–1438. (doi: 10.1093/molbev/msm066)
- Rogers S.M., Gagnon V., Bernatchez L. Genetically based phenotype-environment association for swimming behavior in lake whitefish ecotypes (*Coregonus clupeaformis* Mitchell) // Evolution. 2002. Vol. 56. № 11. P. 2322–2329. (doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00155.x)
- Rogers S.M., Mee J.A., Bowles E. The consequences of genomic architecture on ecological speciation in postglacial fishes // Cur. Zool. 2013. Vol. 59. № 1. P. 53–71.
- Säisä M., Rönn J., Aho T., Björklund M., Pasanen P., Koljonen M.-L. Genetic differentiation among European whitefish ecotypes based on microsatellite data // Hereditas. 2008. Vol. 145. P. 69–83. (doi: 10.1111/j.2008.0018-0661.02050.x)

- Sajdak S.L., Phillips R.B. Phylogenetic relationships among *Coregonus* species inferred from the DNA sequence of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1997. Vol. 54. № 4. P. 1494–1503. (doi: 10.1139/f97-057)
- Sajdak S.L., Reed K.M., Phillips R.B. Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of Coregonid fish // *J. Mol. Evol.* 1998. Vol. 46. № 6. P. 680–688. (doi: 10.1007/PL00006348)
- 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. Resources.* 2008. Vol. 8. P. 1212–1218. (doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02350.x)
- Schulz M., Freyhof J., Saint-Laurent R., Østbye K., Mehner T., Bernatchez L. Evidence for independent origin of two spring-spawning ciscoes (Salmoniformes: Coregonidae) in Germany // *J. Fish Biology.* 2006. Vol. 68. (Suppl. A). P. 119–135. (doi: 10.1111/j1095-8649.2006.01039.x)
- Sendek D.S. Electrophoretic studies of Coregonid fishes from across Russia // *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 2002. Vol. 57. P. 35–55.
- Sendek D.S. Intra-species alliance of the European whitefish *Coregonus lavaretus* L. and vendace *Coregonus albula* L. from the Russian part of the Gulf of Finland and the Largest Lakes of the Eastern Baltic Basin // *Oceanology.* 2012. Vol. 52. № 6. P. 790–796. (doi: 10.1134/S0001437012060124)
- Sendek D.S., Ivanov E.V., Khodulov V.V., Novoselov A.P., Matkovsky A.K., Ljutikov A.A. Genetic differentiation of coregonid populations in Subarctic areas // *Advanc. Limnol.* 2013. Vol. 64. P. 223–246. (doi: 10.1127/1612-166X/2013/0064-0014)
- Sendek D.S., Novoselov A.P., Studenov I.I., Gurichev P.A. The origin of Coregonid fishes of the White Sea Kuloi Plato // *Adv. Limnol.* 2012. Vol. 63. P. 209–227. (doi: 10.1127/advlim/63/2012/209)
- St-Cyr J., Derome N., Bernatchez L. The transcriptomics of life-history trade-offs in whitefish species pairs (*Coregonus* sp.) // *Mol. Ecol.* 2008. Vol. 17. P. 1850–1870. (doi: 10.1111/j1365-294X.2008/03696.x)
- Sukhanova L.V., Smirnov V.V., Smirnova-Zalumi N.S., Belomestnykh T.V., Kirilchik S.V. Molecular phylogeography of Lake Baikal coregonid fishes // *Advanc. Limnol.* 2012. Vol. 63. P. 261–283. (doi: 10.1127/advlim/63/2012/261)
- Sukhanova L.V., Smirnov V.V., Smirnova-Zalumi N.S., Kirilchik S.V., Griffiths D., Belikov S.I. The taxonomic position of the Lake Baikal omul *Coregonus autumnalis migratorius* (Gorgi), as revealed by sequence analysis of the mtDNA cytochrome *b* gene and control region // *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 2002. Vol. 57. P. 97–106.
- Sukhanova L.V., Smirnov V.V., Smirnova-Zalumi N.S., Kirilchik S.V., Shimizu I. Grouping of Baikal omul *Coregonus autumnalis migratorius* Georgi within the *C. lavaretus* complex confirmed by using a nuclear DNA marker // *Ann. Zool. Fennici.* 2004. Vol. 41. № 1. P. 41–49.
- Svärdson G. The Coregonid problem. I. Some general aspects of the problem // *Rep. Institute of Freshwater Research. Drottningholm.* 1949. Report № 29. P. 89–101.
- Svärdson G. The Coregonid problem. II. Morphology of two Coregonid species in different environments // *Institute of Freshwater Research. Drottningholm.* 1950. Report № 31. P. 151–162.
- Svärdson G. The Coregonid problem. IV. The significance of scales and gillrakers // *Institute of Freshwater Research. Drottningholm.* 1952. Report № 33. P. 204–232.
- Svärdson G. Speciation of Scandinavian *Coregonus* // *Institute of Freshwater Research. Drottningholm.* 1979. Report № 57. 95 p.
- Symonová R., Majtánová Z., Sember A., Staaks G.B.O., Bohlen J., Freyhof J., Rábová M., Ráb P. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications // *BMC Evol. Biol.* 2013. Vol. 13. P. 42–52. (doi: 10.1186/1471-2148-13-42)
- Turgeon J., Estoup A., Bernatchez L. Species flock in the North American Great Lakes: molecular ecology of Lake Nipigon ciscoes (Teleostei: Coregonidae: *Coregonus*) // *Evolution.* 1999. Vol. 53. № 6. P. 1857–1871.
- Tsuyuki H., Uthe J.F., Roberts E., Clarke L.W. Comparative electrophoregrams of *Coregonus clupeaformis*, *Salvelinus namaycush*, *S. alpinus*, *S. malma*, and *S. fontinalis* from the Family Salmonidae // *J. Fish. Res. Board Can.* Vol. 23. № 10. P. 1599–1606. (doi: 10.1139/f66-148)
- Vonlanthen P., Roy D., Hudson A.G., Largiadèr C.R., Bittner D., Seehausen O. Divergence along a steep ecological gradient in lake whitefish (*Coregonus* sp.) // *J. Evol. Boil.* 2009. Vol. 22. P. 498–514. (doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01670.x)
- Vonlanthen P., Bittner D., Hudson A.G., Young K.A., Müller R., Lundsgaard-Hansen B., Roy D., Di Piazza S., Largiadèr C.R., Seehausen O. Eutrophication causes speciation reversal in whitefish adaptive radiations // *Nature.* 2012. Vol. 482. P. 357–363. (doi: 10.1038/nature10824)
- Vuorinen J. Electrophoretic expression of genetic variation and duplicate gene activity in vendace, *Coregonus albula* (Salmonidae) // *Hereditas.* 1984a. Vol. 101. P. 85–96. (doi: 10.1111/j.1601-5223.1984.tb00453.x)
- Vuorinen J. Enzyme genes as interspecific hybridization probes in Coregoninae fishes // *Finn. Fish. Res.* 1988. Vol. 9. P. 31–37.

- Vuorinen J., Himberg M.K.-J., Lankinen P. Genetic differentiation in *Coregonus albula* (L.) (Salmonidae) populations in Finland // *Hereditas*. 1981. Vol. 94. P. 113–121. (doi: 10.1111/j.1601-5223.1981.tb01740.x)
- Whiteley A.R. Trophic polymorphism in a riverine fish: morphological, dietary, and genetic analysis of mountain whitefish // *Biol. J. Linn. Soc.* 2007. Vol. 92. P. 253–267. (doi: 10.1111/j.1095-8312.2007.00845.x)
- Whiteley A.R., Derome N., Rogers S.M., St-Cyr J., Laroche J., Labbe A., Nolte A., Renaut S., Jeukens J., Bernatchez L. The phenomics and expression Quantitative Trait Locus mapping of brain transcriptomes regulating adaptive divergence in lake whitefish species pairs (*Coregonus* sp.) // *Genetics*. 2008. Vol. 180. № 1. P. 147–164. (doi: 10.1534/genetics.108.089938)

## USE OF MOLECULAR GENETIC MARKERS IN PHYLOGENY AND PHYLOGEOGRAPHY OF COREGONID FISHES

**E. A. Borovikova**

*I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences  
152742 Yaroslavl region, Borok, e-mail: elena.ibiw@gmail.com*

Whitefishes are diversified group of phenotypically and ecologically plastic species inhabited cool freshwaters of Holarctic region. In the current review, I analyze results of molecular studies of coregonids published during last decades, and discuss the sources of outstanding morpho-ecological plasticity of these fishes. Analysis of the literature data argues for complex use of different methodological approaches such as analysis of nucleotide sequences variation, gene expression together with phenotypic polymorphism to elucidate issues of genetic bases of divergence of different species and forms. Despite some restrictions in use of molecular approaches, they can be successfully used to solve many issues in taxonomy, phylogeny and phylogeography of coregonids. Usage of molecular markers is also helpful in an assessment of dynamics of genetic diversity of populations and species as well as in a management of the stocks of this commercially important group of fishes.

*Keywords:* coregonid fishes, molecular genetics, genetic polymorphism, speciation.

## О ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОМ ПОЛОЖЕНИИ ЕЛЬЦА ДАНИЛЕВСКОГО *LEUCISCUS DANILEWSKII* (CYPRINIDAE) ПО ДАННЫМ мтДНК

Б. А. Лёвин

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: borislyovin@mail.ru

Впервые выполнена оценка филогенетического положения ельца Данилевского *Leuciscus danilewskii*, эндемика Дона, с применением молекулярно-генетических методов. Согласно филогенетическому анализу последовательностей гена цитохрома *b* (1089 п.н.), елец Данилевского является хорошо дивергировавшим видом, сестринским по отношению к ельцу обыкновенному *Leuciscus leuciscus* (*p*-дистанция = 8.40±1.80%). В Верхнем Дону отмечен случай гибридизации между этими видами.

**Ключевые слова:** цитохром *b*, ельцы *Leuciscus*, филогенетический анализ, MrBayes, Cyprinidae, Понто-Каспийский бассейн.

### ВВЕДЕНИЕ

Ельцы рода *Leuciscus* считались обширной группой карповых рыб, насчитывающей порядка 90 видов. Молекулярные филогенетические исследования последних двух десятилетий показали, что данная группа полифилетична. Значительная часть видов была отнесена к родам *Squalius* и *Telestes*, в то же время некоторые другие рода (например, *Aspius*) было предложено синонимизировать с родом *Leuciscus* (Perea et al., 2010). Несмотря на довольно интенсивные исследования европейских карповых (Briolay et al., 1998; Zardoya, Doadrio, 1999; Ketmaier et al., 2004; Perea et al., 2010), включая программу генетического штрихкодирования рыб Европы (Geiger et al., 2014), значительная часть видов, обитающих в Восточной Европе, оказалась генетически все еще не изученной. Хотя в данном регионе имеется достаточно много ситуаций, которые можно прояснить с применением инструментария молекулярной генетики.

Елец Данилевского *Leuciscus danilewskii* (Kessler) — эндемик Донского бассейна. Данный вид считается близким видом обыкновенному ельцу *Leuciscus leuciscus* (L), ареал которого фактически окружает ареал донского эндемика (Атлас рыб ..., 2003). Мнения о таксономическом статусе ельца Данилевского различны. Его рассматривали в качестве подвида ельца обыкновенного (Дрягин и др., 1954; Мовчан, Смирнов, 1981; Васильева и др., 1993; Лёвин, 2002), считали экологической формой данного вида или вообще считали младшим синонимом ельца обыкновенного (Щербуха, 1972). Богущая (1987), изучив строение нейро-спланхнокраниума ельцов, пришла к выводу о видовой самостоятельности ельца Данилевского. В Атласе рыб России (2003) таксономический ранг ельца Данилевского — видовой.

Нужно отметить, что в верховьях Дона отмечено обитание обоих видов (Атлас рыб ..., 2003; Иванчев и др., 2013), и если между ними есть гибридизация, то это может в еще большей

степени затруднять оценку отношений этих видов, особенно по признакам фенотипа.

Для уточнения филогенетического положения ельца Данилевского и прояснения его отношений с обыкновенным ельцом нами впервые привлечены молекулярно-генетические данные. Анализ филогенетических отношений ельцов выполнен с применением последовательностей гена мтДНК цитохрома *b*, активно используемого для целей филогении, в том числе, в семействе карповых (Zardoya, Doadrio, 1999; Costedoat et al., 2006; Levin et al., 2012).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетические образцы *L. danilewskii* и *L. leuciscus* были собраны в ходе полевых выездов в период 2011–2013 гг. (таблица). Данные образцы хранятся в настоящее время в генетической коллекции Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (ИБВВ РАН). Помимо собственных сборов, использовали последовательности гена цитохрома *b* представителей родов *Leuciscus*, *Squalius*, *Aspius*, *Ballerus* и *Telestes* из генбанка (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

ДНК выделяли из плавников рыб, фиксированных в 96% этаноле, по стандартному солевому методу (Aljanabi, Martinez, 1997). Условия ПЦР: 35 циклов 94°C (20 с), 52°C (30 с), 72°C (1 мин), финальный цикл достройки цепей 72°C (10 мин). Амплификацию гена цитохрома *b* производили с использованием праймеров GluDg 5'-TGACTTGAARAACCAAYCGTTG-3' и H16460 5'-CGAYCTTCGGATTACAAGACCG-3' (Palumbi, 1991; Perdices, Doadrio, 2001). Полученные ПЦР-продукты визуализировали в 1.5%-ном агарозном геле, а затем очищали ПЦР-продукт с использованием этанола 96% и ацетата натрия (ЗМ). Последовательности нуклеотидов считывали на автоматическом секвенаторе ABI3500 в ИБВВ РАН в соответствии с инструкцией производителя.

Гомологичные участки последовательностей были проверены на ошибки в программе

FinchTV 1.4.0 (Rothgänger et al., 2006) и выровнены с использованием пакета программ MEGA6 (Tamura et al., 2013) в соответствии с опубликованными в генбанке (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) последовательностями цитохрома *b*.

Для проведения филогенетического анализа использовали фрагменты гена цитохрома *b* (*cytb*) длиной 1089 п.н. Частота встречаемости нуклеотидов была следующей: А = 0.247, С = 0.285, G = 0.172, Т = 0.296. Количество переменных сайтов составило 446 (40.96%), парсимони-информативных сайтов — 349 (32.05%). С помощью информационного критерия Акаике (AIC), внедренного в программу jModelTest 2.1.5 (Posada, 2008), определяли оптимальную модель эволюции (GTR+G+I), параметры которой была

использована для последующего анализа. Байесовские заключения (Bayesian inferences - BI) получены при использовании программы MrBayes v3.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) симуляцией двух одновременных МСМС-цепей в 5000000 генераций каждая для определения распределения апостериорной вероятности (posterior probabilities). Топологию деревьев собирали каждые 100 генераций. Первые 25% деревьев были удалены (burn-in). Анализ проводили на удаленном кластере суперкомпьютера филогенетического ресурса CIPRES (Miller et al., 2010). В качестве аутгруппы выбрана последовательность обыкновенного гольяна *Phoxinus phoxinus* (L) EF094550 из генбанка NCBI. *P*-дистанции рассчитаны в программе MEGA6 (Tamura et al., 2013).

**Таблица.** Исследованный материал

№	Места сбора материала	Бассейн	Число последовательностей	Географические координаты или номер из генбанка NCBI
<i>Leuciscus danilewskii</i>				
1*	р. Дон у заповедника «Галичья гора», Липецкая обл.	Азовское море	4	52°36' с.ш. 38°56' в.д.
2*	р. Дон у с. Ступино, Воронежская обл.	Азовское море	1	50°37' с.ш. 39°55' в.д.
<i>Leuciscus leuciscus</i>				
3*	р. Непрядва, приток Дона, Тульская обл.	Азовское море	4	53°39' с.ш. 38°32' в.д.
4*	р. Ветлуга, приток Волги, Респ. Марий-Эл	Каспийское море	1	56°19' с.ш. 46°22' в.д.
5*	р. Кадада, Волжский бассейн, Пензенская обл.	Каспийское море	1	52°55' с.ш. 46°16' в.д.
6*	р. Ус, бас. Печоры, Респ. Коми	Баренцево море	1	63°24' с.ш. 48°42' в.д.
7	р. Либечовка, приток р. Эльбы, Чехия	Северное море	1	HM560101
8	р. Морава, приток Дуная	Черное море	1	DQ664410
9	р. Висла	Балтийское море	1	DQ664443
10	р. Трент, Великобритания	Северное море	1	AY509823
11	оз. Боденское, Германия	Северное море	1	AJ555553
12	р. Сазава, приток Эльбы	Северное море	1	HM560100
13	р. Бланице, бас. Эльбы	Северное море	1	DQ664446
14	р. Нив, Франция	Атлантический Океан	1	DQ664306
15	р. Айн, приток Роны, Франция	Средиземное море	1	DQ664302
<i>Leuciscus baicalensis</i>				
16	р. Иртыш, приток Оби, Китай	Карское море	1	NC 024528
17*	р. Челек, приток оз. Балхаш, Казахстан	Бессточный бас.	1	43°46' с.ш. 78°11' в.д.
18	Китай	НД	1	KF552099
<i>Leuciscus idus</i>				
19	р. Либечовка, приток р. Эльбы, Чехия	Северное море	1	HM560099
20	р. Дунай, Словакия	Черное море	1	AY026397
<i>Leuciscus schmidtii</i>				
21	оз. Иссык-Куль, Киргизия	Бессточный бас.	1	AY026396

Таблица. (окончание)

№	Места сбора материала	Бассейн	Число последовательностей	Географические координаты или номер из генбанка NCBI
<i>Leuciscus waleckii</i>				
22	оз. Дали, бас. Меконга, Китай	Южно-Китайское море	1	KF312806
<i>Ballerus ballerus</i>				
23	р. Дунай, Словакия	Черное море	1	AY026409
<i>Petroleuciscus borysthenicus</i>				
24	оз. Комана, Румыния	Черное море	1	AJ252815
<i>Petroleuciscus smyrnaeus</i>				
25	р. Буюк-Мендерез, Турция	Эгейское море	1	AJ252813
<i>Squalius aradensis</i>				
26	бассейн р. Араде, Португалия	Атлантический Океан	1	AF421825
<i>Squalius carolitertii</i>				
27	бассейн р. Дуэро	Атлантический Океан	1	AF421799
<i>Squalius cephalus</i>				
28	НД	НД	1	AJ252807
29	р. Дрин, Италия	Адриатическое море	1	AJ252798
<i>Squalius illiricus</i>				
30	р. Цетина, Хорватия	Адриатическое море	1	AJ251094
<i>Squalius keadicus</i>				
31	р. Евротас, Греция	Средиземное море	1	AJ252820
<i>Squalius lepidus</i>				
32	оз. Бейсехир, Турция	Бессточный бас.	1	AJ252812
<i>Squalius lucumonis</i>				
33	р. Тибр, Италия	Средиземное море	1	AJ252819
<i>Squalius peloponnensis moreoticus</i>				
34	бассейн оз. Стимфалия, Греция	Бессточный бассейн?	1	AF090758
<i>Squalius pyrenaicus</i>				
35	р. Эбро, Испания	Средиземное море	1	AJ252821
<i>Squalius zrmanjae</i>				
36	р. Зрмания, Хорватия	Адриатическое море	1	AJ251093
<i>Telestes muticellus</i>				
37	р. Омбронне, Италия	Тирренское море	1	AY838934
<i>Telestes polylepis</i>				
38	ручей у Жоспидола, Хорватия	Адриатическое море	1	AY509824
<i>Telestes souffia</i>				
39	оз. Боденское, Германия	Северное море	1	AJ555549

\* — наши данные; НД — нет данных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Елец Данилевского *L. danilewskii* образует отдельный кластер с высоким уровнем поддержки (поддержка апостериорной вероятности, post. prob. = 1) и является сестринским видом ельцу обыкновенному *L. leuciscus*, в дерево которого встраивается так же и язь *L. idus* (рис.). Случаи гибридизации между обыкновенным ельцом и язём задокументированы молекулярными методами (Costedoat et al., 2006). Используемые нами последовательности из генбанка NCBI относятся как раз к гибридным особям. Обсуждение филогенетического положения язя и его гибридизационных связей с ельцом не является предметом настоящей статьи.

Уровень генетической дивергенции между ельцом обыкновенным и ельцом Данилев-

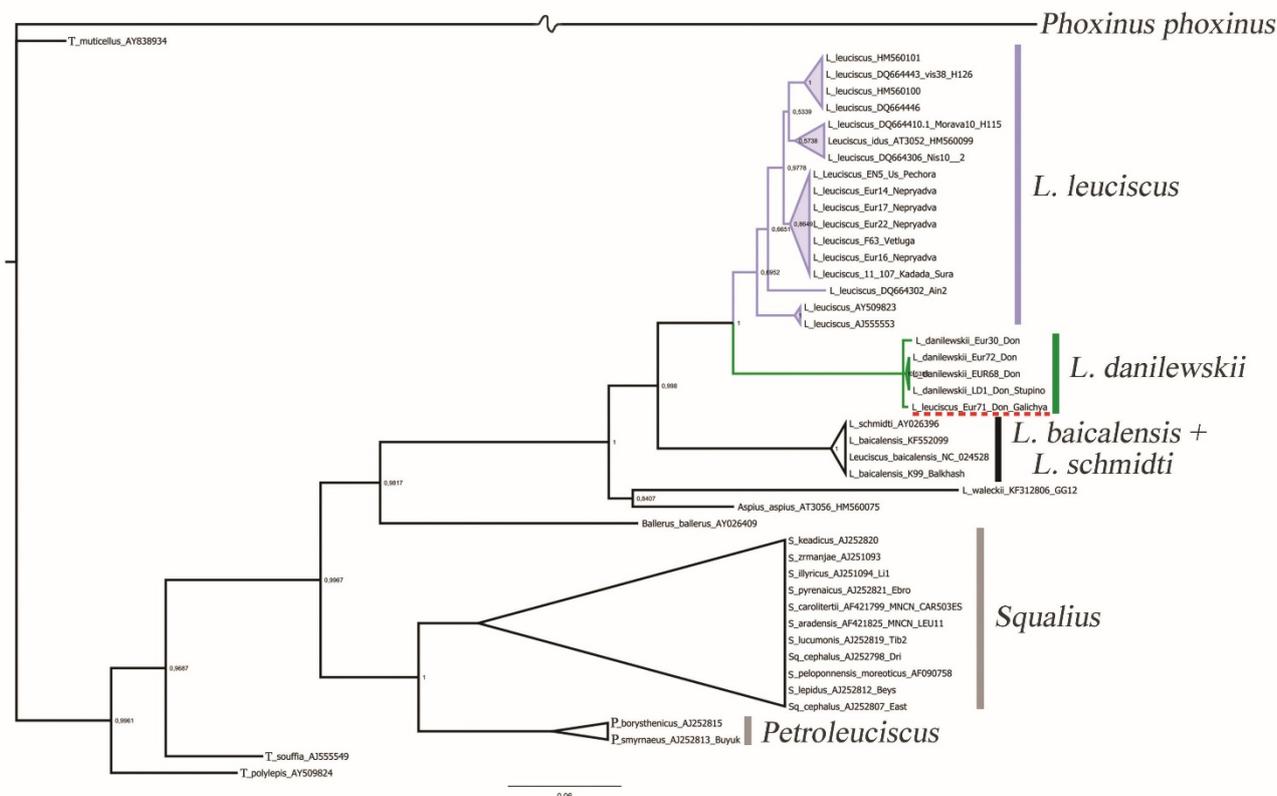
ского весьма велик ( $p$ -дистанция =  $8.40 \pm 1.80\%$ ), что свидетельствует о давней дивергенции ельца Данилевского от общей с обыкновенным ельцом предковой формы.

Будучи объединены в одну кладу, оба вида ельца являются сестринской группой сибирскому ельцу *L. baicalensis* и исык-кульскому чебаку *L. schmidti* (post. prob. = 0.99).

Одна особь из бассейна Верхнего Дона, фенотипически более сходная с обыкновенным ельцом, в частности по числу чешуй в боковой линии ( $H = 48$ , счет производили до конца чешуйного покрова), имела гаплотип ельца Данилевского (подчеркнута красной прерывистой линией на рисунке). Это, по всей видимости, говорит о гибридизации между видами — недавней или отдаленной. Поскольку обыкновенный елец весьма распространен на Верхнем

Дону (Иванчев и др., 2013), гибридизация двух видов ельцов может оказаться довольно частым явлением. Гибридизация в группе ельцовых рыб весьма обычна (Dürand et al., 2000; Costedoat et al., 2006) и вносит существенный вклад в эволюционную историю данной группы. Из-

вестны случаи полной интрогрессии мтДНК отдельных видов. Например, все 28 изученных особей голавля *Squalius lepidus* (Турция) обладали последовательностью фрагмента цитохрома *b* обыкновенного голавля *Squalius cephalus* (Dürand et al., 2000).



**Рис.** VI-дерево филогенетических отношений ельца Данилевского *L. danilewskii* по последовательностям цитохрома *b* (1089 п.н.). Числа в узлах отражают апостериорную вероятность Байезовских заключений. Шкала масштаба отражает 6% оцененной дивергенции последовательностей.

Васильевой с соавторами (1993) при анализе фенетического разнообразия ельцов установлено, что популяции ельца Данилевского из Верхнего Дона в большей степени сходны с обыкновенным ельцом из бассейна Оки, нежели ельцы из других участков бассейна Дона. Вероятно, эту близость можно объяснить гибридизацией этих видов в верховьях Дона. Верхний Дон имел недавнюю связь с верховьями притоков Волги (Берг, 1949), что было подтверждено недавно молекулярными методами на примере

проникновения украинской миноги *Eudontomyzon mariae* из бассейна Дона в бассейн Волги (Ермаков и др., 2013; Levin et al., 2016).

Таким образом, елец Данилевского — генетически хорошо дивергировавшая линия, безусловно, являющаяся самостоятельным видом. В Верхнем Дону отмечен случай гибридизации обыкновенного ельца и ельца Данилевского. Насколько частой является гибридизация между этими видами, еще предстоит оценить.

**Благодарности.** Я выражаю глубокую признательность всем участникам полевых выездов, совместно с которыми были добыты пробы — А.А. Болотовскому, Н.Ш. Мамилову, В.С. Сарычеву, В.К. Фарсенину, а также А.А. Боброву за генетический образец ельца из бассейна р. Печоры и О.А. Ермакову за образец ельца из бассейна р. Суры. Весьма признателен М.А. Лёвиной за помощь с выделением ДНК и постановкой ПЦР. Выражаю благодарность также рецензенту за ценные замечания по рукописи. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда 15-14-10020.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Атлас пресноводных рыб России: В 2 т. Т. 1. Ю.С. Решетников, О.Л. Попова, Л.И. Соколов и др. М.: Наука, 2002. 379 с. Atlas presnovodnykh ryb Rossii: V 2 t. T. 1. - Yu.S. Reshetnikov, O.L. Popova, L.I. Sokolov i dr. M.: Nauka, 2002. 379 p. [Atlas of Russian Freshwater Fishes: Vol. 1. Yu.S. Reshetnikov, O.L. Popova, L.I. Sokolov et al. M: Science, 2002. 379 p.] In Russian

Богуцкая Н.Г. О таксономическом статусе ельца Данилевского (Cyprinidae) // Фауна, морфология и экология рыб // Труды Зоол. Ин-та АН СССР. 1987. Т. 162. Л: Зоол. Ин-т АН СССР. С. 73-80. Bogutskaya N.G. O tak-

- sonomicheskome statuse el'tsa Danilewskogo (Cyprinidae) // Fauna, morfologija i ekologiya ryb. 1987. Trudy Zool. In-ta AN SSSR. T. 162. L: Zool. In-t AN SSSR. S. 73-80. [Bogutskaya N.G. To taxonomical status of the Danilewskiy dace (Cyprinidae) // Fauna, morphology, and ecology of fishes. 1987. Proceedings of Zoological Institute of Academy of Sciences of USSR. V. 162. Leningrad: Zoological Institute of Academy of Sciences of USSR. P. 73–80] In Russian
- Васильева Е.Д., Мина М.В., Павлинов И.Я. К анализу фенетического разнообразия ельцов (подрод *Leuciscus*, Cyprinidae). Положение *Leuciscus danilewskii* // Вопросы ихтиологии. 1993. Т. 33. № 4. С. 475–485. Vassilieva E.D., Mina M.V., Pavlinov I.Ya. K analizu feneticheskogo raznoobraziya el'tsov (podrod *Leuciscus*, Cyprinidae). Polozhenie *Leuciscus danilewskii* // Voprosy Ikhtologii. 1993. T. 33. № 4. S. 475–485. [Vassilieva E.D., Mina M.V., Pavlinov I.Ya. To analysis of phenetic diversity of daces (subgenus *Leuciscus*, Cyprinidae). Position of *Leuciscus danilewskii* // Journal of Ichthyology. 1993. V. 33. № 4. P. 475–485] In Russian
- Берг Л. С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран: в 2 частях. Часть 2. АН СССР Ленинград. 1949. 927 с. Berg L. S. Ryby presnykh vod SSSR i sopredel'nykh stran: v 2 chastyah. Chast' 2. AN SSSR Leningrad. 1949. 927 s. [Berg L. S. Fishes of fresh waters of the USSR and adjacent countries: in 2 parts. Part 2. Academy of Sciences of the USSR. Leningrad. 1949, 927 p.] In Russian
- Дрягин П.А., Галкин Г.Г., Сорокин С.М. Условия размножения и рост рыб в Цимлянском водохранилище в первый год его существования // Изв. ВНИОРХ. 1954. Т. 34. С. 134–155. Dryagin P.A., Galkin G.G., Sorokin S.M. Usloviya razmnozheniya i rost ryb v Tsimlyanskom vodokhranilishche v pervyi god ego sushchestvovaniya // Izv. VNIORKH. 1954. T. 34. S. 134–155. [Dryagin P.A., Galkin G.G., Sorokin S.M. Conditions of reproduction and growth of fishes in Tsimlyanskoe Reservoir during first year of its existence // Transactions of VNIORKH. 1954. V. 34. P. 134–155] In Russian
- Ермаков А.С., Лёвин Б.А., Ермаков О.А. Генетическая изменчивость украинской миноги *Eudontomyzon mariae* на северо-восточной границе ареала по данным секвенирования контрольного региона мтДНК // XXI век: Итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. 2013. № 17 (1). С. 17 In Russian 21. Ermakov A.S., Levin B.A., Ermakov O.A. Geneticheskaya izmenchivost' ukrainskoi minogi *Eudontomyzon mariae* na severo-vostochnoi granice areala po dannym sekvenirovaniya kontrol'nogo regiona mtDNK // XXI vek: Itogi proshlogo i problem nastoyashchego plyus. 2013. №17 (1). S. 17 In Russian 21. [Ermakov A.S., Levin B.A., Ermakov O.A. Genetic diversity of Ukrainian brook lamprey *Eudontomyzon mariae* on north-eastern border of range inferred from mtDNA control region // XXI century: Resumes of the Past and Challenges of the Present plus. V. 17 (1). P. 17 In Russian 21] In Russian
- Иванчев В.П., Сарычев В.С., Иванчева Е.Ю. Миноги и рыбы бассейна Верхнего Дона // Труды Окского государственного природного биосферного заповедника. 2013. Вып. 28. Рязань, «Голос губернии», 275 с. Ivanchev V.P., Sarychev V.S., Ivancheva E.Yu. Minogi i ryby basseina Verkhnego Dona // Trudy Okskogo gosudarstvennogo prirodnogo biosfernogo zapovednika. 2013. Vyp. 28. Ryazan', "Golos gubernii", 275 s. [Ivanchev V.P., Sarychev V.S., Ivancheva E.Yu. Lampreys and fishes of the Upper Don basin // Proceedings of Okskiy State Natural Biospheric Reserve. 2013. No. 13. Ryazan', 'Golos gubernii', 275 p.] In Russian
- Лёвин Б.А. Елец Данилевского (*Leuciscus*: Cyprinidae) в верховьях реки Хопер // Фауна и экология животных. 2002. Вып. 3. Пенза. Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского. С. 52–54. Levin B.A. Elets Danilewskogo (*Leuciscus*: Cyprinidae) v verkhoviyakh reki Khoper // Fauna i ekologiya zhivotnykh. 2002. Vyp. 3. Penza. Penzenskiy gosudarstvennyi universitet im. V.G. Belinskogo. S. 52–54. [Levin B.A. Danilewskiy dace (*Leuciscus*: Cyprinidae) in the upper reach of the Khoper River // Fauna and ecology of animals. 2002. No. 3. Penza. Penza State Pedagogical University named after V.G. Belinskiy. P. 52–54]
- Мовчан Ю.В., Смирнов А.И. Коропові // Фауна України. 1981. Т. 8. Риби. Ви. 2. Ч. 1. 424 с. Movchan Yu.V., Smirnov A.I. Koropovi // Fauna Ukraini. 1981. T. 8. Ribi. Vi. 2. Ch. 1. 424 s. [Movchan Yu.V., Smirnov A.I. Koropovi // Fauna of Ukraine. 1981. V. 8. Fishes. No. 2. Pt. 1. 424 p.] In Ukrainian
- Щербуха А.Я. К систематике ельцов подрода *Leuciscus* из Сев. Донца и Днепра // Гидробиол. Журн. 1972. Т. 8. № 3. С. 69–75. Shcherbukha A.Ya. K sistematike el'tsov podroda *Leuciscus* iz Sev. Dontsa i Dnepra // Gidrobiol. Zhurn. 1972. T. 8. № 3. S. 69–75. [Shcherbukha A.Ya. To systematics of daces of subgenus *Leuciscus* from the Sev. Donets and Dnieper // Hydrobiological Journal. 1972. V. 8. No. 3. P. 69–75] In Russian
- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Research. 1997. Vol. 25. P. 4692–4693.
- Briolay J., Galtier N., Brito R.M., Bouvet Y. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequences // Molecular phylogenetics and evolution. 1998. Vol. 9. P. 100–108.
- Costedoat C., Chappaz R., Barascud B., Guillard O., Gilles A. Heterogeneous colonization pattern of European Cyprinids, as highlighted by the dace complex (Teleostei: Cyprinidae) // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2006. Vol. 41. P. 127–148.
- Dürand J.D., Erhan Ü., Doadrio I., Pipoyan S., Templeton A.R. Origin, radiation, dispersion and allopatric hybridization in the chub *Leuciscus cephalus* // Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 2000. Vol. 267. P. 1687–1697.
- Geiger M.F., Herder F., Monaghan M.T., Almada V., Barbieri R., Bariche M., ... & Denys G.P. Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes // Molecular ecology resources. 2014. Vol. 14. P. 1210–1221.

- Ketmaier V., Bianco P.G., Cobolli M., Krivokapic M., Caniglia R., De Matthaes E. Molecular phylogeny of two lineages of Leuciscinae cyprinids (*Telestes* and *Scardinius*) from the peri-Mediterranean area based on cytochrome *b* data // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2004. Vol. 32. P. 1061–1071.
- Levin B., Ermakov A., Ermakov O., Levina M., Sarycheva O., Sarychev V. 2016. Ukrainian Brook Lamprey *Eudontomyzon mariae* (Berg): Phylogenetic Position, Genetic Diversity, Distribution, and Some Data on Biology. In Orlov A. and Beamish R. (eds.) *Jawless Fishes of the World*. Vol. 1. Cambridge Scholars Publishing. P. 58–82.
- Levin B.A., Freyhof J., Lajbner Z., Perea S., Abdoli A., Gaffaroğlu M., Özuluğ M., Rubenyan H.R., Salnikov V.B., Doadrio I. Phylogenetic relationships of the algae scraping cyprinid genus *Capoeta* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2012. Vol. 62. P. 542–549.
- Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees // *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. 14 Nov. 2010, New Orleans, LA. P. 1–8.
- Palumbi S. 1991. Simple fool's guide to PCR.
- Perea S., Böhme M., Zupančič P., Freyhof J., Šanda R., Özuluğ M., ... & Doadrio I. Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data // *BMC Evolutionary Biology*. 2010. Vol. 10. 1.
- Perdices A., Doadrio I. The molecular systematics and biogeography of the European cobitids based on mitochondrial DNA sequences // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 19. P. 468–478.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging // *Molecular biology and evolution*. 2008. Vol. 25. P. 1253–1256.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. 2003. Vol. 19. P. 1572–1574.
- Rothgänger J., Weniger M., Weniger T., Mellmann A., Harmsen D. Ridom TraceEdit: a DNA trace editor and viewer // *Bioinformatics*. 2006. Vol. 22. P. 493–494.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Molecular biology and evolution*. 2013. mst197.
- Zardoya R., Doadrio I. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids // *Journal of Molecular Evolution*. 1999. Vol. 49. P. 227–237.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

## **PHYLOGENY OF *LEUCISCUS DANILEWSKII* (CYPRINIDAE) AS INFERRED FROM mtDNA ANALYSIS**

**B. A. Levin**

*Papanin Institute of Biology of Inland Waters, IBIW RAS  
152742 Borok, Nekouz distr., Yaroslavl Prov., Russia. E-mail: borislyovin@mail.ru*

Phylogeny of endemic dace from the Don riverine system, *Leuciscus danilewskii* was reconstructed using cytochrome *b* sequences (1089 bp). Our results confirmed taxonomic status of that endemic form as separated species and revealed its sister position to *Leuciscus leuciscus*. The high genetic distance between two sister species ( $p$ -distance = 8.40±1.80%) suggests old divergence event from common ancestor. Despite high divergence between species, the hybridization has been detected in the Upper Don, where both species co-occur.

*Keywords:* cytochrome *b*, dace *Leuciscus*, phylogenetic analyses, MrBayes, Cyprinidae, Ponto-Caspian basin.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ОЗЁРНОЙ ЛЯГУШКИ (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* COMPLEX) ЗАПАДНОГО КАВКАЗА ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЯДЕРНОЙ ДНК

О. А. Ермаков<sup>1</sup>, Е. П. Симонов<sup>2,3</sup>, А. Ю. Иванов<sup>1</sup>, Р. И. Замалетдинов<sup>4</sup>, А. И. Файзуллин<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Пензенский государственный университет

440026 г. Пенза, ул. Красная, 40, e-mail: oaermakov@list.ru

<sup>2</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, ИБВВ РАН, e-mail: ev.simonov@gmail.com

<sup>3</sup>Томский государственный университет

634050 г. Томск, пр. Ленина, 36

<sup>4</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет

420008 г. Казань, ул. Кремлевская, 18, e-mail: i.ricinus@rambler.ru

<sup>5</sup>Институт экологии Волжского бассейна РАН

445003 Самарская обл., г. Тольятти, ул. Комзина, 10, e-mail: amvolga@inbox.ru

Проведен молекулярно-генетический анализ 73 особей *Pelophylax ridibundus* complex из 14 пунктов, расположенных на территории Краснодарского края, Республики Адыгея, Абхазии, Грузии и Армении по двум молекулярным маркерам — первой субъединице гена цитохром оксидазы (COI) мтДНК и первому интрону гена сывороточного альбумина (SAI-1) яДНК. Установлено, что у озерных лягушек, обитающих на Западном Кавказе, преобладает тип мтДНК специфичный для “восточной” формы (= азиатская *P. cf. bedriagae*), единично отмечен вариант характерный для “евфратской” озерной лягушки (“Euphrates”), и полностью отсутствует тип мтДНК характерный для “западной” (= центрально-европейская *P. ridibundus*) формы. В тоже время анализ ядерного маркера показал присутствие в изученном регионе аллелей “западной” формы озерной лягушки, которые встречаются здесь значительно реже, чем “восточной”, в соотношении частот приблизительно равном 1:3.

**Ключевые слова:** озерная лягушка, *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax cf. bedriagae*, цитохром оксидаза, сывороточный альбумин, Кавказ.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на основе молекулярно-генетических и биоакустических данных озерная лягушка *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) рассматривается как комплекс видов (Боркин и др., 2004; Plötner, 2005; Plötner et al., 2008, 2012; Schneider, Sinsch, 1999). В Среднем и Нижнем Поволжье озерная лягушка представлена двумя генетически дифференцированными формами – “западной” (= центрально-европейская *P. ridibundus*) и “восточной” (= азиатская *P. cf. bedriagae*) (Ермаков и др., 2013, 2014; Зак и др., 2013). На Кавказе “восточная” форма озерной лягушки впервые диагностирована на территории Армении по биоакустическим данным (Шнейдер, Егиазарян, 1989) и косвенно – по размеру генома (Литвинчук и др., 2008), кариологическим признакам (Martirosyan, Stepanyan, 2009) и размерным показателям эритроцитов и тела (Арзуманян и др., 2013). Кроме того, обитание *P. cf. bedriagae*, а также сестринской ей “евфратской” формы (“Euphrates”) на Кавказе и сопредельных территориях подтверждено анализом первичных последовательностей митохондриальных генов ND2 и ND3 (Akin et al., 2010). Для озерных лягушек Армении и Нагорного Карабаха отмечено наличие митохондриальных гаплотипов

(ND2, ND3) специфичных *P. cf. bedriagae* и ядерных аллелей (SAI, RanaCR1) двух форм – азиатской и центрально-европейской *P. ridibundus* (Stepanyan et al., 2011). В задачи настоящего исследования входило изучение распределения маркеров митохондриальной и ядерной ДНК (далее мт- и яДНК) “восточной” и “западной” форм у озерных лягушек, обитающих на территории Армении, Грузии и причерноморской части Северного Кавказа.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор материала проведен в 2014–2015 гг. Всего молекулярно-генетическим методом исследовано 73 особи из 14 пунктов, расположенных на территории Краснодарского края (1 пункт), Республики Адыгея (1), Абхазии (1), Грузии (3) и Армении (8) (табл. 1).

В качестве образцов тканей для выделения ДНК методом высаливания (Aljanabi, Martinez, 1997) брали первые фаланги пальцев задних конечностей или мазок эпителия ротовой полости, фиксированные в 96% этаноле. Молекулярно-генетический анализ проведен в лаборатории молекулярной экологии и систематики животных при кафедре зоологии и экологии Пензенского государственного университета. Использовались 2 молекулярно-генетических маркера: для мтДНК — фрагмент первой субъ-

единицы гена цитохром оксидазы (COI), для яДНК — интрон 1 гена сывороточного альбумина (SAI-1). В первом случае, при помощи универсальных праймеров (Lisovsky et al., 2010) амплифицировался фрагмент гена COI, методом секвенирования определялась его первичная структура, а затем по видоспецифичным заменам проводился скрининговый рестрикционный анализ, позволяющий определять принадлежность гаплотипов мтДНК к “восточной” или “западной” форме (Ермаков и др., 2013). Во втором случае использовались праймеры из

работы Й. Плётнера с соавторами (Plötner et al., 2009), а видоспецифичные замены для рестрикционной диагностики форм определялись по первичной структуре интрона 1 гена SAI экземпляров *P. ridibundus* и *P. cf. bedriagae* (Закс и др., 2013; Hauswaldt et al., 2012; Plötner et al., 2012) из базы данных GenBank NCBI. “Евфратская” озерная лягушка диагностировалась рестрикционным анализом на основе первичной последовательности второй субъединицы гена NADH-дегидрогеназы (ND2) мтДНК.

**Таблица 1.** Объем, места и годы сбора исследованных образцов

№	Локалитет	n	Координаты		Высота н.у.м., м	Год
			с.ш., °	в.д., °		
<b>Россия</b>						
1	Краснодарский край, окр. г. Геленджика	3	44.400	38.200	28	2014
2	Республика Адыгея, Майкопский р-н, пос. Каменномостский	1	44.261	40.166	355	2014
<b>Абхазия</b>						
3	окр. г. Сухум	17	43.000	41.000	9	2014
<b>Грузия</b>						
4	Самегрело и Земо-Сванети, окр. г. Абаша, р. Абаша	8	42.240	42.190	18	2015
5	Аджария, окр. г. Батуми, р. Чорох	3	41.592	41.597	34	2015
6	Шида-Картли, окр. г. Гори, р. Б. Лиави	4	42.035	44.068	631	2015
<b>Армения</b>						
7	Ширакская обл., окр. пос. Гарнарич, р. Кармиджур	1	41.084	43.609	2049	2015
8	Ширакская обл., окр. пос. Тавшут, лев. приток р. Ахурян	1	41.076	43.805	2027	2015
9	Лорийская обл., пос. Ташир, р. Ташир	8	41.091	44.169	1627	2015
10	Лорийская обл., пос. Степанаван, р. Дзорагет	6	41.013	44.383	1364	2015
11	Тавушская обл., окр. пос. Айрум, р. Дебед	1	41.206	44.905	505	2015
12	Армавирская обл., окр. г. Вагаршапат, р. Касах	8	40.178	44.265	885	2015
13	Котайкская обл., окр. пос. Бюреган, р. Раздан	11	40.322	44.586	1271	2015
14	Гехаркуникская обл., окр. пос. Еранос, оз. Севан	1	40.213	45.235	1925	2015

Примечание: Номера, указанные перед адресом, соответствуют таковым на рисунке и в таблице 2.

ПЦР проводили в стандартной реакционной смеси в течение 30 циклов в обобщенном режиме: 94°C — 1 мин, 60°C — 1 мин, 72°C — 2 мин. ПЦР-фрагменты гидролизовали рестрикционными эндонуклеазами: *RsaI* (сайт GTAC) для гена COI, *HaeII* (RGCGCY) для гена ND2 мтДНК, *TasI* (AATT) и *TruI* (TTAA) для первого интрона гена SA яДНК. После рестрикции амплификационные смеси анализировали при помощи электрофореза в 6%-ном ПААГ с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

При расчете частот встречаемости гаплотипов учитывалось, что мтДНК является гаплоидной и формально может рассматриваться как один аллель, поэтому количество аллелей и экземпляров равно. Ядерная ДНК диплоидна, содержит два аллеля одного гена, соответственно доли аллелей и экземпляров той или иной формы различны в зависимости от соотношения гомо- и гетерозиготных особей. Раз-

личия частот аллелей оценивались с помощью двустороннего критерия Фишера ( $F$ , two-tailed) в программе STATISTICA v.10 (StatSoft).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Результаты анализа митохондриальной ДНК** показали преобладание на территории Западного Кавказа митотипа, специфичного для “восточной” формы. Этот тип мтДНК отмечен у 97% исследованных озерных лягушек (71 экз. из 13 точек, табл. 2), что согласуется с полученными ранее сведениями о широком распространении *P. cf. bedriagae* в восточной части Средиземноморского региона и Причерноморье (Akin et al., 2010). Оставшиеся 3% (2 экз. из 2 точек) лягушек имели тип мтДНК характерный для “евфратской” формы (табл. 2), являющейся сестринской к *P. cf. bedriagae* s. s. с небольшим процентом различий, равным 1.8% (дистанция Тимуры-Нея по генам ND2 и ND3; Akin et al., 2010). “Евфратская” лягушка

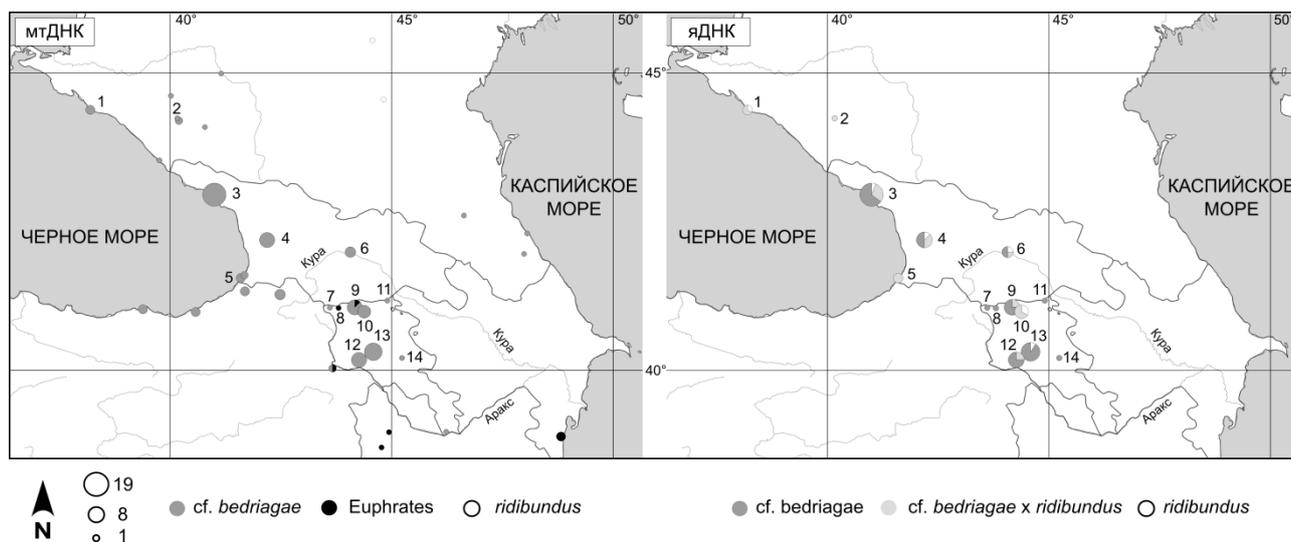
распространена от Персидского залива на юге, вдоль бассейна рек Тигра и Евфрата, до восточной Турции и западного Ирана на севере (Akin et al., 2010; Pesarakloo et al., 2016), где встречается совместно с “восточной” формой. Наши находки “евфратской” формы в Армении указывают, что граница распространения проходит на 120 км севернее – до 41° с.ш. (рис.). При этом одна находка (точка № 8, Тавшут) расположена в верховьях бассейна реки Аракса, в средней и нижней части которого “евфратская” лягушка отмечена и по литературным

данным. Однако другая точка (№ 9, Ташир), находящаяся в 30 км к востоку, относится к бассейну Куры, что показывает возможность расселения особей с “евфратским” митотипом через невысокие нагорья, разделяющие бассейны этих рек – расстояние по прямой между истоками некоторых рек/ручьев, относящихся к разным бассейнам, составляет менее 9 км. Из 8 лягушек, отловленных в точке № 9, лишь у одной обнаружен специфичный для “евфратской” формы митотип, остальные 7 имели мтДНК “восточной” формы (табл. 2).

**Таблица 2.** Соотношение типов мт- и яДНК в выборках озерных лягушек ( $n = 73$ ) Западного Кавказа

№	Локалитет	n	COI мтДНК		SAI-1 яДНК		
			В	“Е”	ВВ	BR	RR
1	Геленджик	3	3	–	–	2	1
2	Каменноостровский	1	1	–	–	1	–
3	Сухум	17	17	–	11	5	1
4	Абаша	8	8	–	4	3	1
5	Батуми	3	3	–	–	3	–
6	Гори	4	4	–	2	1	1
7	Гарнарич	1	1	–	1	–	–
8	Тавшут	1	–	1	1	–	–
9	Ташир	8	7	1	6	2	–
10	Степанаван	6	6	–	–	4	2
11	Айрум	1	1	–	1	–	–
12	Вагаршапат	8	8	–	6	2	–
13	Бюреган	11	11	–	10	–	1
14	Еранос	1	1	–	1	–	–
	<b>ИТОГО</b>	73	71	2	43	23	7
		(100%)	(97%)	(3%)	(59%)	(31%)	(10%)

Примечание: В — гаплотипы мтДНК и аллели яДНК “восточной” формы, “Е” — гаплотипы мтДНК “евфратской” формы, R — аллели яДНК “западной” формы.



**Рис.** Распределение гаплотипов митохондриальной и аллелей ядерной ДНК у озерных лягушек Западного Кавказа. Номера точек соответствуют табл. 1 и 2, точки без нумерации – литературные данные (по: Akin et al., 2010).

Предполагается, что дивергенция двух рассматриваемых форм озерной лягушки произошла 1.1–1.0 млн. лет и связана со значительным похолоданием и изменениями рельефа на границах Анатолийской, Аравийской и Ев-

разийской плит, что привело к сокращению ареала и изоляции отдельных генетических линий (Akin et al., 2010; Plötner et al., 2010). В то же время малая генетическая дистанция, перекрывание ареалов и совместное обитание “вос-

точной” и “евфратской” митохондриальных форм, в том числе и на территории Западного Кавказа, свидетельствуют об их конспецифичности. Отметим, что особи с мтДНК характерной для “западной” формы, нами не обнаружены. Ближайшие места находок лягушек с мтДНК *P. ridibundus* s. s. отмечены севернее — на территории Ставропольского края и Астраханской области выше 44° с.ш. (Akin et al., 2010; наши неопубликованные данные).

**Результаты анализа ядерной ДНК** показали, что кроме аллелей гена SAI, характерного для “восточной” формы, у озерных лягушек Западного Кавказа встречаются аллели, специфичные для “западной” формы, при соотношении частот аллелей приблизительно равном 3:1. Большинство изученных особей (59%) являлись гомозиготами (BB) и диагностировались как “восточная” форма, 31% были гетерозиготами (BR) и 10% — гомозиготами (RR) “западной” формы (табл. 2). Однако при отсутствии в общей выборке “западного” типа мтДНК более вероятно, что особи, несущие оба специфичных для “западной” формы аллеля ядерного гена, являются результатом выщепления при скрещиваниях гетерозигот. С этим согласуется и тот факт, что практически все (6 из 7) гомозиготные особи RR-типа обнаружены в поселениях, где присутствуют гетерозиготные экземпляры. Наши данные позволяют предположить, что на территории Западного Кавказа нет “чистых” поселений лягушек “восточной” формы, т.к. во всех точках отлова, где выборка составила более одной особи, обнаружены аллели *P. ridibundus* s. s. (рис.). Кроме того, на уровне тренда прослеживается зависимость распределения частот аллелей от высоты над уровнем моря. В целом с увеличением высоты местности доля аллелей “западной” формы уменьшается: от соотношения частот приблизительно равного 2:1 на высотах менее 500 м н.у.м. до 4:1 — в локалитетах, расположенных на больших высотах ( $\chi^2=4.45$ ,  $p=0.0509$ ).

Полученные результаты выявили несоответствие частот распределения маркеров мт- и яДНК у озерных лягушек Западного Кавказа, а именно — отсутствие “западных” гаплотипов мтДНК при наличии “западных” аллелей в ядерном геноме. Если результаты анализа маркера мтДНК показали наличие в общей выборке только гаплотипов *P. cf. bedriagae* s. l., то исследования маркера яДНК выявили присутствие в выборке аллелей *P. ridibundus* s. s. на уровне 25%. Различия частот встречаемости аллелей мт- и яДНК двух форм достоверны ( $\chi^2=20.49$ ,  $p<0.0001$ ). Подобная ситуация может объясняться двумя причинами.

1) Дивергенция центрально-европейской и анатолийских озерных лягушек, рассчитанная по последовательностям маркеров мтДНК, произошла около 6 млн. лет назад и была связана с геодинамическими процессами, в первую очередь с началом Мессинского кризиса солёности (MSC) (Plötner et al., 2010; 2012). Во время последнего плейстоценового оледенения ареал *P. ridibundus* s. s. должен был значительно сократиться на севере и сдвинуться к югу, в том числе в Причерноморье и на Северный Кавказ. В пользу этой версии свидетельствует тот факт, что южная граница вечной мерзлоты в данной местности проходила в районе 48° с.ш. (Lindren et al., 2016), тогда как современный ареал озерной лягушки находится на значительном удалении от залегания вечной мерзлоты. Таким образом в ходе экспансии на юг *P. ridibundus* s. s. вступала в гибридизацию с *P. cf. bedriagae*, ареал которой также сокращался к югу. При этом Кавказские горы, очевидно, являлись существенным барьером для расселения амфибий, так как во время последнего оледенения на Кавказе (окончившемся примерно 11–10 тыс. лет назад), горные/долинные ледники и перегляциальная зона покрывали значительную часть главного Кавказского хребта (Gobejishvili et al., 2011). Средняя годовая температура была при этом на 7–8°C ниже современных показателей (Gobejishvili et al., 2011). Следовательно, единственным коридором для проникновения *P. ridibundus* s. s. в Закавказье на западе являлось Черноморское побережье, по которому «западная» форма начала свое расселение в Колхидскую низменность и за её пределы. При потеплении, в голоцене, “восточная” форма начала расселение на север и вытеснила “западную” озерную лягушку в процессе поглотительной гибридизации. Такой сценарий, согласующийся с историей климатических изменений в регионе, объясняет наличие клины с северо-запада на юго-восток в частоте встречаемости аллелей *P. ridibundus* s. s. на Западном Кавказе. Следы былой гибридизации обнаруживаются лишь в ядерном геноме в силу менделевского характера его наследования в отличие от мтДНК, наследуемой по материнской линии.

2) Возможно наличие у озерных лягушек Западного Кавказа двух вариантов ядерных маркеров (“западного” и “восточного”) является проявлением анцестрального полиморфизма.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом изучение генетических характеристик озерных лягушек Западного Кавказа подтвердило их принадлежность к митохондриальной гаплогруппе *P. cf. bedriagae* и

впервые выявило особей, имеющих мтДНК “евфратской” формы. Анализ ядерного маркера показал наличие в выборке значительной доли (25%) аллелей центрально-европейской

*P. ridibundus*, что позволяет говорить о широкой зоне вторичного контакта генетически дифференцированных форм.

**Благодарности.** Мы благодарны Н.М. Курмаевой (Пенза, ПГУ) за помощь в сборе материала. Особенно благодарны авторы анонимному рецензенту за конструктивные замечания. Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности ВИУ ТГУ. Исследование также поддержано Российским научным фондом (грант № 15-14-10020; сбор материала).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Арзумян М.В., Варданян А.И., Степанян И.Э., Аракелян М.С. Межпопуляционная изменчивость по размерам тела и эритроцитов у озерной лягушки, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) в Армении // Современная герпетология: проблемы и пути их решения. Статьи по материалам докладов Первой международной молодежной конференции герпетологов России и сопредельных стран (Санкт-Петербург, Россия, 25–27 ноября 2013 г.) / Зоологический институт РАН. СПб., 2013. С. 44–47. Arzumanyan M.V., Vardanyan A.I., Stepanyan I.E., Arakelyan M.S. Mezhpopyulyacionnaya izmenchivost' po razmeram tela i eritrocitov u ozernoi lyagushki, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) v Armenii // Stat'i po materialam dokladov Pervoi mezhdunarodnoi molodezhnoi konferencii gerpetologov Rossii i sopredel'nyh stran (Sankt-Peterburg, Rossiya, 25–27 noyabrya 2013 g.) / Zoologicheskii institut RAN. SPb., 2013. S. 44–47. [Arzumanyan M.V., Vardanyan A.I., Stepanyan I. E., Arakelyan M.S. The interpopulation variability of sizes of body and erythrocytes of the marsh frog, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) from Armenia // Modern herpetology: problems and ways of their solutions. Collection of papers of the First International Conference of the Young Herpetologists of Russia and neighboring countries (Saint-Petersburg, Russia, 25–27 November 2013) / Zoological institute of RAS. Saint-Petersburg, 2013. P. 44–47.] In Russian
- Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Скоринов Д.В. О криптических видах (на примере амфибий) // Зоологический журнал. 2004. Т. 83. № 8. С. 936–960. Borkin L.Ya., Litvinchuk S.N., Rozanov Yu.M., Skorinov D.V. O kripticheskikh vidah (na primere amfibii) // Zoologicheskii zhurnal. 2004. T. 83. № 8. S. 936–960. [Borkin L.J., Litvinchuk S.N., Rozanov Yu.M., Skorinov D.V. On cryptic species (an example of amphibians) // Entomol. Rev. 2004. V. 84. № 1. pp. S75–S98.]
- Ермаков О.А., Закс М.М., Титов С.В. Диагностика и распространение “западной” и “восточной” форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* s. l. в Пензенской области (по данным анализа гена COI мтДНК) // Вестник Тамбовского университета. 2013. Т. 18. № 6. С. 2999–3002. Ermakov O.A., Zaks M.M., Titov S.V. Diagnostika i rasprostranenie “zapadnoi” i “vostochnoi” form ozernoi lyagushki *Pelophylax ridibundus* s. l. v Penzenskoi oblasti (po dannym analiza gena COI mtDNK) // Vestnik Tambovskogo universiteta. 2013. T. 18. № 6. S. 2999–3002. [Ermakov O.A., Zaks M.M., Titov S.V. Diagnostics and distribution of “western” and “eastern” forms of marsh frog *Pelophylax ridibundus* s. l. in the Penza province (on data of analysis of mtDNA cytochrome oxidase gene) // Tambov University Reports. 2013. V. 18. № 6. P. 2999–3002.] In Russian
- Ермаков О.А., Файзулин А.И., Закс М.М., Кайбелева Э.И., Зарипова Ф.Ф. Распространение “западной” и “восточной” форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* s. l. на территории Самарской и Саратовской областей (по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК) // Известия Самарского научного центра РАН. 2014. Т. 16. № 5(1). С. 409–412. Ermakov O.A., Faizulin A.I., Zaks M.M., Kaibeleva E.I., Zaripova F.F. Rasprostranenie “zapadnoi” i “vostochnoi” form ozernoi lyagushki *Pelophylax ridibundus* s. l. na territorii Samarskoi i Saratovskoi oblasti (po dannym analiza mitohondrial'noi i yadernoi DNK) // Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra RAN. 2014. T. 16. № 5(1). S. 409–412. [Ermakov O.A., Fayzulin A.I., Zaks M.M., Kaybeleva E.I., Zaripova F.F. Distribution “western” and “eastern” forms of marsh frog *Pelophylax ridibundus* s. l. in the Samara and Saratov region (on data of analysis of mtDNA and nDNA) // Proceedings of the Samara scientific center of the Russian Academy of Sciences. 2014. V. 16. № 5(1). P. 409–412.] In Russian
- Закс М.М., Быстракова Н.В., Ермаков О.А., Титов С.В. Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*) из Пензенской области // Современная герпетология: проблемы и пути их решения. Статьи по материалам докладов Первой международной молодежной конференции герпетологов России и сопредельных стран (Санкт-Петербург, Россия, 25–27 ноября 2013 г.) / Зоологический институт РАН. СПб., 2013. С. 86–89. Zaks M.M., Bystrakova N.V., Ermakov O.A., Titov S.V. Molekulyarno-geneticheskaya i morfologicheskaya harakteristika ozernyh lyagushek (*Pelophylax ridibundus*) iz Penzenskoi oblasti // Stat'i po materialam dokladov Pervoi mezhdunarodnoi molodezhnoi konferencii gerpetologov Rossii i sopredel'nyh stran (Sankt-Peterburg, Rossiya, 25–27 noyabrya 2013 g.) / Zoologicheskii institut RAN. SPb., 2013. S. 86–89. [Zaks M.M., Bystrakova N.V., Ermakov O.A., Titov S.V. Molecular-genetic and morphological characteristics of marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) from the Penza region // Modern herpetology: problems and ways of their solutions. Collection of papers of the First International Conference of the Young Herpetologists of Russia and neighboring countries (Saint-Petersburg, Russia, 25–27 November 2013) / Zoological institute of RAS. Saint-Petersburg, 2013. P. 86–89.] In Russian

- Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Боркин Л.Я., Скоринов Д.В. Молекулярно-биохимические и цитогенетические аспекты микроэволюции у бесхвостых амфибий фауны России и сопредельных стран // Вопросы герпетологии. Материалы Третьего съезда Герпетологического общества им. А. М. Никольского. (9–13 октября 2006 г, Пушкино). СПб: 2008. С. 247–257. Litvinchuk S.N., Rozanov Yu.M., Borkin L.Ya., Skorinov D.V. Molekulyarno-biohimicheskie i citogeneticheskie aspekty mikroevolyucii u beshvostyh amfibii fauny Rossii i sopredel'nyh stran // Voprosy gerpetologii. Materialy Tret'ego s'ezda Gerpetologicheskogo obshestva im. A. M. Nikol'skogo. (9–13 oktyabrya 2006 g, Pushino). SPb: 2008. S. 247–257. [Litvinchuk S.N., Rosanov J.M., Borkin L.J., Skorinov D.V. Molecular, biochemical and cytogenetic aspects of microevolution in anurans of Russia and adjacent countries // The problems of herpetology. Proceedings of the 3th Meeting of the Nikolsky Herpetological Society (9–13 October 2006, Putschino). Saint-Petersburg, 2008. P. 247–257.] In Russian
- Шнейдер Г., Егиазарян Э.М. Биоакустические исследования озерных лягушек (*Ranidae: Rana ridibunda*) в Армении как вклад в изучение распространения восточной формы // Биолог. ж. Армении. 1989. № 9–10 (42). С. 926–935. Shneider G., Egiazyryan E.M. Bioakusticheskie issledovaniya ozernyh lyagushek (*Ranidae: Rana ridibunda*) v Armenii kak vklad v izuchenie rasprostraneniya vostochnoi formy // Biolog. zh. Armenii. 1989. № 9–10 (42). S. 926–935. [Schneider H., Egiazyryan E.M. Bio-acoustic research of marsh frogs (*Ranidae: Rana ridibunda*) in Armenia as a contribution to the study of the spread of Oriental forms // Biological J of Armenia. 1989. V. 42. № 9–10. P. 926–935.] In Russian
- Akin C., Bilgin C.C., Beerli P., Westaway R., Ohst T., Litvinchuk S.N., Uzzell T., Bilgin M., Hotz H., Guex G.-D., et al. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs have been determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic // J. Biogeogr. 2010. Vol. 37. P. 2111–2124. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2010.02368.x
- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. 1997. Vol. 25. P. 4692–4693.
- Gobejishvili R., Lomidze N., Tielidze L. Late Pleistocene (Würmian) glaciations of the Caucasus // Developments in Quaternary Science. 2011. Vol. 15. P. 141–147. DOI: 10.1016/B978-0-444-53447-7.00012-X
- Hauswaldt J.S., Höer M., Ogielska M., Christiansen D.G., Dziewulska-Szwajkowska D., Czernicka E., Vences M. A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy levels in European water frogs (*Pelophylax*) // Mol. Ecol. Resour. 2012. Sep; 12 (5). P. 797–805. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2012.03160.x
- Lindgren A., Hugelius G., Kuhry P., Christensen T. R., Vandenberghe, J. GIS-based maps and area estimates of northern hemisphere permafrost extent during the Last Glacial Maximum // Permafrost Periglacial Process. 2016. Vol. 27(1). P. 6–16. DOI: 10.1002/ppp.1851
- Lissovsky A. A., Obolenskaya E. V., Abramson N. I., Dokuchaev N. E., Yakimenko V. V., Mal'kova M. G., Bogdanov A.S., Ivanova N. V. Geographic variation of *Microtus middendorffii* (Cricetidae, Arvicolinae, Rodentia) sensu lato studied by craniometrical and mitochondrial features // Russ. J. Theriol. 2010. Vol. 9(2). P. 71–81.
- Martirosyan A., Stepanyan I. Features of the karyotypes of *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 and *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 (Amphibia: Ranidae) from Armenia // Comp. Cytogenet. 2009. Vol. 3(1). P. 11–24. DOI: 10.3897/compcytogen.v3i1.4
- Pesarakloo A., Rastegar-Pouyani E., Rastegar-Pouyani N., Kami H., Najibzadeh M., Khosravani A., Oraie H. The first taxonomic reevaluation of the Iranian water frogs of the genus *Pelophylax* (Anura: Ranidae) using sequences of the mitochondrial genome // Mitochondrial DNA. 2016. DOI: 10.3109/19401736.2015.1127362
- Plötner J. 2005. Die westpaläarktischen Wasserfrösche – Von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. Laurenti Verlag, Bielefeld. 160 s.
- Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Spolsky C., Ohst T., Litvinchuk S. N., Guex G.-D., Reyer H.-U., Hotz H. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palearctic water frogs // J. Evol. Biol. 2008. Vol. 21. P. 668–681. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2008.01527.x
- Plötner J., Köhler F., Uzzell T., Beerli P., Schreiber R., Guex G.D., Hotz H. Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5' truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia) // Mol. Phylogenet. Evol. 2009. Vol. 53. P. 784–791. DOI: 10.1016/j.ympev.2009.07.037
- Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Akin C., Bilgin C.C., Haefeli C., Ohst T., Köhler F., Schreiber R., Guex G.-D., Litvinchuk S.N., Westaway R., Reyer H.-U., Hotz H. Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in eastern Mediterranean water frogs. In: Glaubrecht M, Schneider H (Eds.), Evolution in action. Case studies in adaptive radiation and the origin of biodiversity. Special volume from the SPP 1127 “Radiations – Genesis of Biological diversity. SPP of the DFG. Springer, Heidelberg, Berlin, 2010. pp. 373–403. DOI: 10.1007/978-3-642-12425-9\_18
- Plötner J., Baier F., Akin C., Mazepa G., Schreiber R., Beerli P., Litvinchuk S.N., Bilgin C.C., Borkin L., Uzzell T. Genetic data reveal that water frogs of Cyprus (genus *Pelophylax*) are an endemic species of Messinian origin // Zoosyst. Evol. 2012. Vol. 88 (2). P. 261–283. DOI: 10.1002/zoos.201200021
- Schneider H., Sinsch U. Taxonomic reassessment of Middle Eastern water frogs: bioacoustic variation among populations considered as *Rana ridibunda*, *R. bedriagae* or *R. levantina* // J. Zool. Syst. Evol. Res. 1999. Vol. 37. P. 57–65.
- Stepanyan I., Schreiber R., Plötner J. On the systematic status of water frogs in Armenia and southern part of Nagorno Karabakh republic // Материалы международной научной конференции “Биологическое разнообразие и

проблемы охраны фауны Кавказа”. Ереван, 2011. С. 291–292. [Stepanyan I., Schreiber R., Plotner J. On the systematic status of water frogs in Armenia and southern part of Nagorno Karabakh republic // Proceedings of the international conference “Biological diversity and conservation problems of the fauna of the Caucasus”. Yerevan, 2011. P. 291–292.]

**GENETIC CHARACTERISTICS OF MARSH FROG  
(*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* COMPLEX) FROM THE WESTERN  
CAUCASUS BASED ON MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR DNA DATA**

**O. A. Ermakov<sup>1</sup>, E. P. Simonov<sup>2,3</sup>, A. Ju. Ivanov<sup>1</sup>, R. I. Zamaletdinov<sup>4</sup>, A. I. Fayzulin<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>*Penza State University*

440026 Penza, ul. Krasnaya, 40, e-mail: oaermakov@list.ru

<sup>2</sup>*Papanin Institute for Biology of Inland Water*

152742 Borok, Nekouzskii raion, Yaroslavskaya oblast, e-mail: ev.simonov@gmail.com

<sup>3</sup>*Tomsk State University*

634050 Tomsk, Lenina av., 36

<sup>4</sup>*Kazan Federal University*

420008 Kazan, ul. Kremlevskaya, 18, e-mail: i.ricinus@rambler.ru

<sup>5</sup>*Institute of Ecology of Volga Basin*

445003 Togliatti, Samarskaya oblast, ul. Komzina, 10, e-mail: amvolga@inbox.ru

Molecular genetic analysis of 73 specimen of *Pelophylax ridibundus* complex from 14 locations in Russia (Krasnodarskiy Krai, Republic of Adygea), Georgia and Armenia were conducted using COI and SAI-1 DNA markers. The mtDNA haplotype typical for “eastern” form of marsh frog (= Anatolian *P. cf. bedriagae*) is prevalent in west Caucasus, while haplotype peculiar to the “western” form (= Central European *P. ridibundus*) is fully absent. Two specimens carried a haplotype typical for “Euphrates” line were found in northern Armenia. Analysis of nuDNA nevertheless revealed remarkable presence of alleles belonging to the “western” form of marsh frog in the studied area. The mean ratio of “western” and “eastern” allele frequencies is close to 1:3.

*Keywords:* marsh frog, *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax cf. bedriagae*, cytochrome oxidase, serum albumin, Caucasus.