

Кирюхина Наталья Александровна

Молекулярно-генетическая и морфологическая изменчивость черноморской пухлощечкой иглы-рыбы *Syngnathus nigrolineatus* (Eichwald, 1831) в связи с ее инвазией в водоемы бассейна Волги

03. 02. 06 - ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2013

Работа выполнена в лаборатории экологии водных сообществ и инвазий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН.

Научный руководитель:

академик, профессор, заведующий лабораторией экологии водных сообществ и инвазий ФГБУН ИПЭЭ РАН **Юрий Юлианович Дгебуадзе**

Официальные оппоненты:

Юрий Степанович Решетников

профессор, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологии низших позвоночных ФГБУН ИПЭЭ РАН

Николай Сергеевич Мюге

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной эмбриологии института биологии развития им. Н.К.Кольцова (ФГБУН ИБР) РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики гидробионтов всероссийского научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Защита диссертации состоится 6 ноября 2013 г. в 11.00 на заседании Диссертационного Совета Д 002.213.02 при ФГБУН Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН, по адресу: 119071 г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, факс (495) 952-35-84, e-mail: admin@sevin.ru, www.sevin.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук РАН по адресу: Москва, Ленинский проспект, 33.

Автореферат разослан 4 октября 2013 г.

Учёный секретарь Диссертационного Совета,
кандидат биологических наук

Е.А.Кацман

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В последние десятилетия случаи вселения чужеродных видов в водные сообщества резко участились. Стремительное распространение видов-вселенцев несет в себе опасность, как для экосистем, так и для общества. Изучение генетики видов-вселенцев, с одной стороны, может дать новые знания о ранних этапах дифференцировки популяций, о механизмах, лежащих в основе успеха колонизации, с другой стороны - помогает находить пути и источники инвазии, что имеет большое значение для прогнозирования и проведения превентивных мероприятий (Lee, 2002).

Одним из видов рыб, распространяющихся по водоемам европейской части России, является черноморская пухлощекая игла-рыба *Syngnathus nigrolineatus*. До недавнего времени этот вид населял только прибрежные воды Черного, Азовского и Каспийского морей и устья впадающих в них рек. Выделяют каспийский и черноморский подвиды этого вида (*S. nigrolineatus caspius*, *S. nigrolineatus nigrolineatus*), которые по морфологическим признакам различаются слабо (Берг, 1949). После создания водохранилищ в бассейнах Днепра, Дона и Волги игла-рыба образовала в них устойчивые популяции (Кудерский, 1971; Евланов и др., 1998; Завьялов и др., 2007).

Существуют различные версии относительно проникновения иглы-рыбы в Волгу. Л. А. Кудерский (Кудерский, 1971) полагает, что происходило саморасселение *S. nigrolineatus* из Черного моря в волжские водохранилища, поскольку каспийский подвид высоко в реки не поднимается. Некоторые авторы считают, что игла-рыба могла быть случайно завезена при интродукции беспозвоночных из Дона и Цимлянского водохранилища или же произошло расселение каспийского подвида *S. nigrolineatus* из низовьев Волги (Абрамов и др., 2002; Шаронов, 1971). Обозначенные ранее пути расширения ареала пухлощекой иглы-рыбы основывались на сравнительном анализе морфологии материнских и инвазионных популяций (Гавлена, 1974) и документированных случаях преднамеренной интродукции гидробионтов в бассейны Днепра, Дона и Волги. Однако ввиду незначительности морфологических отличий каспийского и черноморского подвигов и перекрываемости диагностических признаков, результаты морфологического анализа не могут трактоваться однозначно (Кирюхина, 2013). В связи с этим более целесообразным представляется использование молекулярно-генетических методов, обладающих большим разрешением

Интересным вопросом, связанным с пухлощекой иглой-рыбой, является ее видовая принадлежность и отношения с другими видами рода *Syngnathus*. В сравнительно недавних публикациях объединяют *S. nigrolineatus* со средиземноморскими иглами *S. abaster* в один вид *Syngnathus abaster* (Васильева, 2004). Эта точка зрения, а также спорные вопросы, связанные со структурой самого вида *S. nigrolineatus* требуют решения на современном методическом уровне.

Цели и задачи. Основной целью исследования является оценка молекулярно-генетического и морфологического разнообразия пухлощеккой иглы-рыбы *Syngnathus nigrolineatus* Eichwald 1831 в пределах ее современного ареала, а также выявление путей расселения этого вида.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- на основании анализа полиморфизма митохондриальной ДНК уточнить пути инвазии пухлощеккой иглы-рыбы;
- сопоставить генетическое разнообразие в инвазионных и аборигенных популяциях пухлощеккой иглы-рыбы, проверить наличие эффекта основателя;
- оценить филогенетические отношения *S. nigrolineatus* со средиземноморскими иглами *S. abaster*, используя данные базы Генбанк (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>);
- оценить уровень морфологических различий популяций пухлощеккой рыбы-иглы из разных частей современного ареала.

Научная новизна.

Впервые получены данные по изменчивости фрагментов контрольного региона и гена цитохрома b мтДНК для вида *Syngnathus nigrolineatus*. На основании полученных данных сделаны предположения о возможных путях и источниках инвазии. Показано, что популяция среднего Каспия является генетически обособленной, в авандельте Волги были обнаружены одновременно типично каспийские и черноморские гаплотипы, что, может говорить о вторичной инвазии иглы-рыбы в Волгу из волжских водохранилищ. Изучены филогенетические отношения *S. nigrolineatus* со средиземноморской иглой-рыбой *S. abaster* на основании данных из базы Genbank.

Теоретическое значение и практическое значение работы.

Черноморская пухлощеккая игла-рыба представляет собой модельный объект для изучения процесса биологических инвазий чужеродных видов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Популяции волжских водохранилищ *S. nigrolineatus* генетически близки к популяциям Черного моря и вероятно происходят от них.
2. Популяции Каспийского и Черного морей представляют собой генетически обособленные группы.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на трех конференциях: молодежной научной конференции «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых» (Москва, 2010), The III International Symposium "Invasion of alien species in Holarctic. Borok – 3" (Borok – Myshkin, 2010), международной конференции «Проблемы популяционной и общей генетики» (Москва, 2011), а также на коллоквиумах лаборатории экологии водных сообществ и инвазий Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН (2008-2012 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ, 3 из них в издании из «списка ВАК».

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 81 странице текста и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа включает 9 таблиц и 14 рисунков.

Благодарности.

Автор благодарен научному руководителю Ю.Ю.Дгебуадзе за руководство и создание условий для выполнения данной работы; М.В. Холодовой за помощь в освоении методов, рекомендации и замечания при обсуждении полученных данных и поддержку на всех этапах работы; А.А.Махрову и В.А.Артамоновой за ценные замечания при подготовке рукописи диссертации, а также сотрудникам кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН и всем коллегам, оказавшим помощь в сборе материала: А.К.Устарбекову, Ю.А.Малининой, В.В.Осипову, Е. Д.Васильевой и В.П.Васильеву.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ПРОБЛЕМЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНВАЗИЙ ЧУЖЕРОДНЫХ ВИДОВ

Раздел 1. Экологические и генетические аспекты биологических инвазий чужеродных видов.

Рассматриваются экологические и генетические факторы, которые могут быть связаны с успешностью инвазий чужеродных видов. Приводятся данные о генетических маркерах, используемых для изучения видов-вселенцев.

Раздел 2. Понто-Каспийский регион. Геологическая история. Инвазии чужеродных видов в XX веке.

Описывается геологическая история Черного и Каспийского морей. Приведены основные направления инвазий гидробионтов в Понто-Каспийском регионе в XX веке. Рассматриваются данные о биологии пухляцкой иглы-рыбы *S. nigrolineatus* и ее расселении в водоемах бассейна Волги.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Раздел 1. Сбор материала.

Нами был использован материал из 8 популяций *Syngnathus nigrolintatus* (табл. 1). Кроме того, были собраны три экземпляра *S. typhle* (табл. 1). Все образцы, кроме выборки из реки Дон (Ростов-на-Дону) хранились в 96% спирте. Образцы из реки Дон в районе Ростова-на-Дону были зафиксированы в формалине, поэтому не использовались для генетического анализа. Объемы выборок из различных популяций для генетического и морфологического анализа приведены в таблице. Всего использовано 266 особей для морфологического и 142 - для генетического анализа.

Таблица 1. Состав и описание изученных выборок.

Название Выборки	Место сбора.	Nm	Ng
ВЛГ	Волгоградское вдхр., в черте г. Саратова 2006	74	19
ВОЛ	Дельта Волги, река Кривой Бузан, 2008	11	11
АВА	Авандельта, Раскаты, 2010	21	19
ДАГ	Каспийское море, бухта Сулак, устье Терека, 2008	19	14
ДОН1	Р. Дон, в районе Ростова-на-Дону, 2003	45	0
ДОН2	Р. Дон база ЮНЦ РАН, 2010	5	2
ДНЕ	Днепровский лиман, 2009	31	25
ЧЕР	Черное море, Таманский залив <i>S. nigrolineatus</i> , 2007	31	31
	Черное море, Таманский залив <i>S. typhle</i> , 2007	0	3
КУБ	Куйбышевское вдхр. 2010	29	28

Примечание: Nm – объем выборки взятой для морфологического анализа; Ng – объем выборки взятой для генетического анализа.

Раздел 2. Морфологический анализ.

Выполнены следующие промеры: длина тела (без хвостового плавника) - ad, длина головы (до конца жаберной крышки) – ao, длина рыла (до начала глазницы) - ap. Поскольку основным диагностическим признаком для различия подвидов является относительная длина рыла, для морфологического анализа мы использовали такие индексы как отношение длины головы к длине тела (индекс H) и длины рыла к длине тела (индекс S). Также подсчитывали число лучей в спинном плавнике (D). Кроме того, считали число грудных (Nr) и хвостовых (Nt) поясков, количество лучей в грудном плавнике (P), поскольку у некоторых видов игл-рыб эти признаки являются довольно изменчивыми. Для оценки внутригрупповой

изменчивости использовали показатель внутривидового разнообразия Животовского μ (1982). Первичная обработка данных проводилась в программе Statistica 6.0. Для попарного сравнения выборок между собой использовался непараметрический критерий Манна-Уитни, поскольку проводились множественные сравнения, была введена поправка Бонферони на уровень значимости ($p = \alpha/N \approx 0,002$, где α – корректируемый уровень значимости ($\alpha=0,05$), N – число попарных сравнений ($N=21$)). Выборка из дельты Волги была исключена из сравнения из-за ее малого объема. В среде для статистического программирования и вычислений R (версия 2.5.13) <http://www.r-project.org/> считались коэффициенты корреляции Спирмена ρ и проведен анализ главных компонент.

Раздел 2. Анализ генетического разнообразия.

Экстракция ДНК проводилась из кусочка ткани туловищного отдела рыбы с помощью набора реагентов Diatom Prep (Изоген, Москва, Россия) согласно протоколу производителя.

Для амплификации контрольного региона мтДНК и гена цитохрома *b* *S. nigrolineatus* и *S. typhle* были разработаны две пары праймеров: (Prleft 15499) 5'-CGCCGGTCTTGTAAC-3', (Prright 16419) 5'-ТААСАТСТТС-АГТГТТАТГСТТТАТ-3' и (Fcytb 14295) 5'-СТТГААААССАССГТТГ-ТААТ-3', (Rcytb 15135) 5'-ААГААГТАТКАТТСТГГСТТААТАТГ – 3' соответственно.

Определение последовательности ДНК проводили на автоматическом анализаторе ABI 310 с использованием соответствующих праймеров и набора ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle sequencing kit v.3.1 (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколами фирмы изготовителя.

Сравнение с другими видами рода *Syngnathus* из базы Genbank производилась с помощью программы “Blast” на сайте NCBI (National Center for Biotechnology Information) www.ncbi.nlm.nih.gov.

Лабораторная часть работы проведена в Межинститутском кабинете методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН, а секвенирование ДНК - в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН <http://www.genome-centre.narod.ru/>.

Полученные последовательности были выравнены с помощью программы BioEdit 7.0.9.0. (Hall, 1999). Нуклеотидное (π) и гаплотипическое (H) разнообразие и реконструкция гаплотипов производилась в программе DNASP v5 (Librado & Rozas, 2009). Расчет индексов F_{st} (бутстреп тест 5000 повторностей) и тест Рэймонда и Роуссета (Raymond, Rousset, 1995) (для проверки гипотезы о равенстве распределений гаплотипов между популяциями) проводились в программе Arlequin v.3.5.1.2. (Excoffier, Lischer, 2010). Сети гаплотипов строились в программах Network 4.5 (Bandelt et al. 1999), TSC 1.21 (Clement et al., 2000). С помощью программы JmodelTest 2.0.2 (Guindon, Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012) были выбраны модели нуклеотидных замен для фрагментов контрольного региона: 1- (TPM2uf+I+G)

и 2 -(TPM1uf+I+G); для гена цитохрома b: 1 - (TIM2+G) и 2 - (TIM2+I) (1 – для дерева на основании фрагмента мтДНК длиной 1066 п.н.; 2 – для дерева на основании фрагмента мтДНК длиной 750 п.н.). В программе MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) был проведен байесовский филогенетический анализ для объединенных фрагментов гена цитохрома b и контрольного региона мтДНК (длиной 1066 п.н. и 750 п.н.) с использованием приведенных выше моделей (2 запуска, 5000000 генераций алгоритма MCMC, 50000 деревьев для расчета достоверности). В программе PhyML 3.0. (Guindon et al, 2010) были построены деревья методом наибольшего правдоподобия (ML) (модель нуклеотидных замен - GTR; бутстреп тест 1000 повторностей). Также были посчитаны генетические дистанции (p) на основании двухпараметрической модели (Kimura, 1980) в программе Mega v5 (Tamura et al., 2007).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

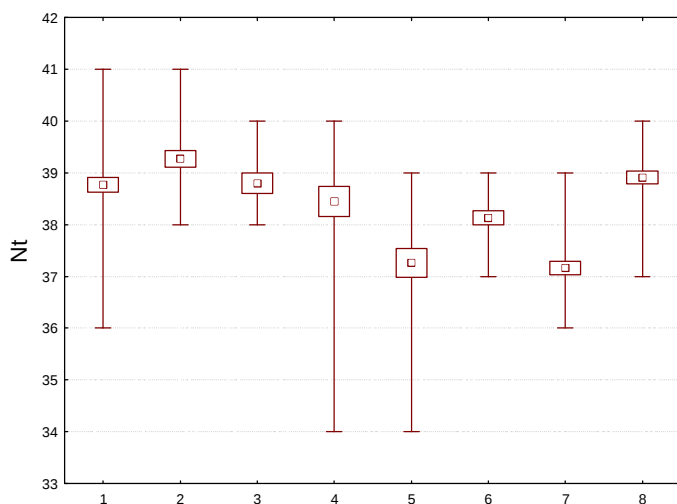
Раздел 1. Анализ морфологических признаков Syngnathus nigrolineatus из популяций бассейнов Черного и Каспийского морей.

Все изученные нами образцы укладываются в размерный ряд от 58 до 177 мм; в среднем более крупными оказались рыбы из Куйбышевского водохранилища ($135,9 \pm 4,2$), более мелкими - рыбы из выборок Черного и Каспийского морей, Днепровского лимана ($84,4 \pm 3,5$; $97,8 \pm 3,7$, $102,0 \pm 3,4$ соответственно). Рыбы из Волгоградского водохранилища ($119,8 \pm 1,5$), Дона ($125,51 \pm 2,0$) авандельты Волги ($116,0 \pm 2,0$) и дельты Волги ($125,8 \pm 3,1$) занимают промежуточное положение по длине. Диапазоны значений длины тела между разными выборками пересекаются.

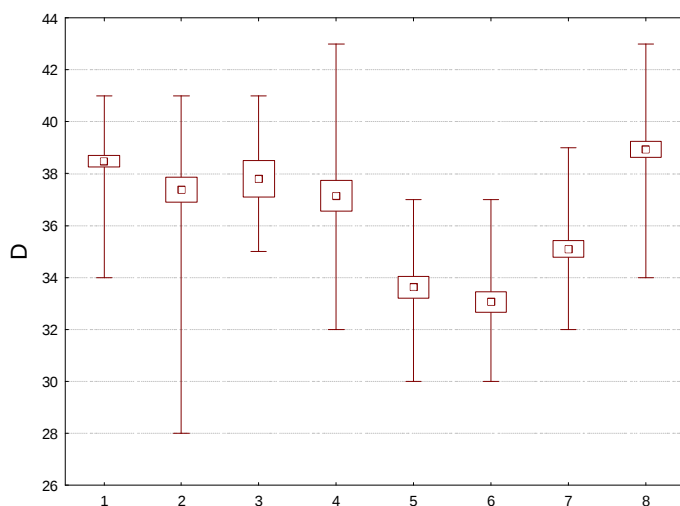
Берг (1949) и Мовчан (1988) отмечают небольшое увеличение числа лучей в спинном плавнике и количества хвостовых поясков с возрастом рыб. Мы посчитали коэффициенты корреляции Спирмена r между длиной тела рыб и другими используемыми признаками для каждой популяции отдельно (выборка из дельты Волги была исключена из анализа из-за ее малого объема). Достоверной корреляции признаков с длиной тела не найдено для наших выборок. При подсчете коэффициентов корреляции на всей выборке прямая зависимость от размера особи, хоть и невысокая, обнаружилась для числа лучей в грудном плавнике, числа лучей в спинном плавнике, количества хвостовых поясков (коэффициенты корреляции равны соответственно 0,200, 0,509 и 0,41 $p < 0,001$). Небольшая обратная зависимость от длины тела найдена для индекса Н (коэффициент корреляции - 0,27, $p < 0,001$). Эти данные, безусловно, нельзя распространить на отдельные популяции, и полученные корреляции признаков с длиной тела могут не отражать реальную ситуацию, но, тем не менее, возможно при увеличении объема наших выборок из отдельных локальностей можно было бы установить такие зависимости.

Исследованные нами индексы Н и S в среднем оказались максимальными для рыб из Каспийского моря (что согласуется с данными Берга (1949)) (рис. 1 Д, Е). Следует отметить, что для обоих индексов характерно перекрытие диапазонов значений между различными выборками. Для многих выборок найдены достоверные различия по этим признакам. Парные различия между каспийской выборкой и остальными по обоим индексам достоверны для всех выборок, кроме выборки Днепровского лимана (табл. 2). Выборка из Черного моря достоверно отличается по обоим индексам от днепровской и каспийской выборки, а также от волгоградской выборки по индексу Н и от куйбышевской по индексу S. Интересно, что выборки из дельты Волги (р. Кривой Бузан) и авандельты Волги по средним значениям индексов ближе к популяциям черноморского бассейна и волжских водохранилищ, чем к каспийской выборке. Этот факт согласуется с результатами молекулярно-генетического анализа мтДНК (см. глава 3 раздел 2), согласно которому рыбы из дельты Волги и волжских водохранилищ близки к черноморским.

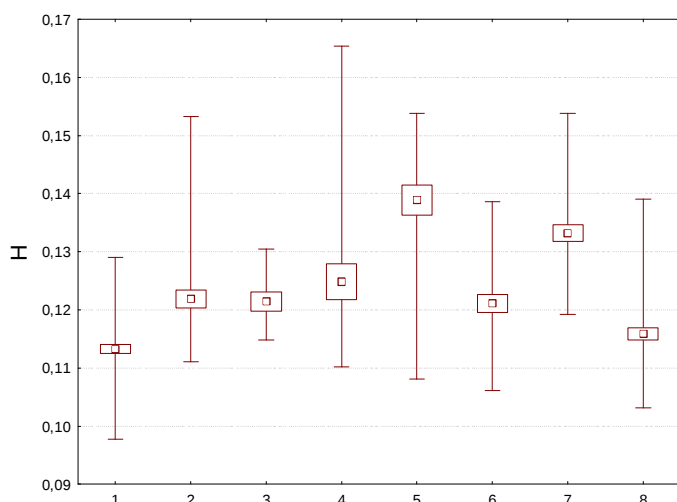
А)



Б)



В)



Г)

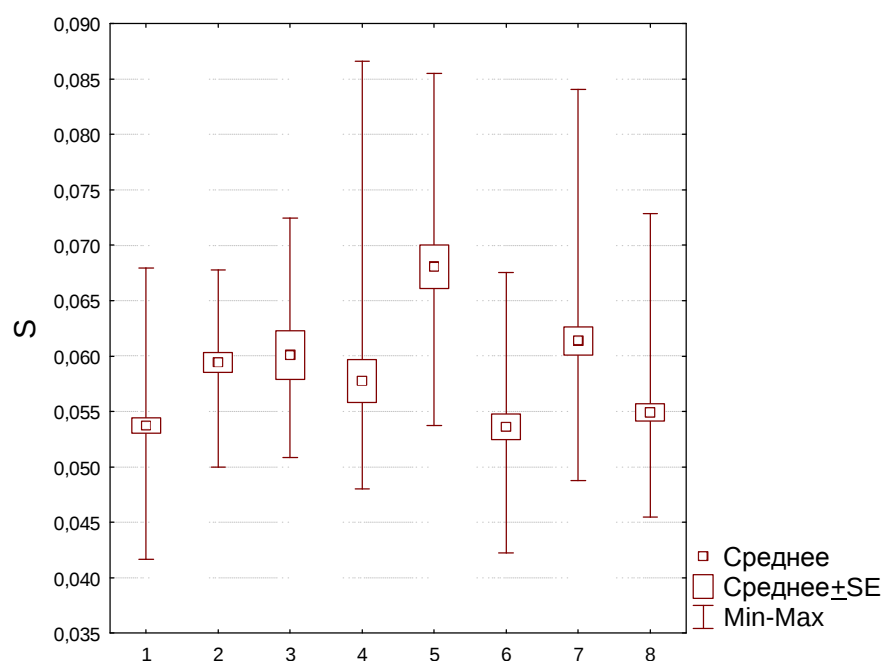


Рис. 1. Значения признаков Nt (А), D (Б,) и индексов Н (В), S (Г) в разных выборках иглы-рыбы. 1 – Волгоградское водохранилище, 2 – Куйбышевское водохранилище, 3 – дельта Волги, 4 – авандельта Волги, 5 – Каспийское море, 6 – Черное море, 7 – Дон, 8 – Днепровский лиман.

Среди счетных признаков наименее изменчивым оказались число лучей в грудном плавнике (Р) и количество грудных поясков (Nr). Значения индексов Животовского μ , отражающие число морф, присутствующих в популяции, наименьшие для этих признаков (табл. 3). Для большинства особей во всех популяциях характерно 16 колец в грудном отделе и 12 лучей в грудном плавнике, за исключением популяций Волгоградского

водохранилища и Дона (13 лучей). Возможно, последнее сходство не случайно, и является следствием занесения иглы-рыбы в Волгоградское водохранилище при интродукции беспозвоночных из Дона.

Таблица 2. Сравнение выборок иглы-рыбы по различным признакам.

Водоем, N	Признаки	Уровни значимости (критерий Манна-Уитни)						
		1	2	3	4	5	6	7
1 Волгоградское вдхр n=74	N t		НД	< 0,002	НД	< 0,002	НД	НД
	D		НД	< 0,002	НД	< 0,002	< 0,002	НД
	H		< 0,002	< 0,002	НД	< 0,002	< 0,002	< 0,002
	S		НД	< 0,002	НД	< 0,002	НД	< 0,002
2 Авандельта Волги n=21	N t	НД		< 0,002	НД	< 0,002	НД	НД
	D	НД		< 0,002	НД	НД	< 0,002	НД
	H	< 0,002		< 0,002	НД	< 0,002	НД	НД
	S	НД		< 0,002	НД	НД	НД	НД
3 Каспийское Море n=19	N t	< 0,002	< 0,002		< 0,002	НД	НД	< 0,002
	D	< 0,002	< 0,002		< 0,002	НД	НД	< 0,002
	H	< 0,002	< 0,002		< 0,002	НД	< 0,002	< 0,002
	S	< 0,002	< 0,002		< 0,002	НД	< 0,002	< 0,002
4 Дон n=45	N t	НД	НД	< 0,002		< 0,002	< 0,002	НД
	D	НД	НД	< 0,002		< 0,002	< 0,002	НД
	H	НД	НД	< 0,002		< 0,002	НД	< 0,002
	S	НД	НД	< 0,002		< 0,002	НД	< 0,002
5 Днепровский лиман n=31	N t	< 0,002	< 0,002	НД	< 0,002		< 0,002	< 0,002
	D	< 0,002	НД	НД	< 0,002		< 0,002	< 0,002
	H	< 0,002	< 0,002	НД	< 0,002		< 0,002	< 0,002
	S	< 0,002	НД	НД	< 0,002		< 0,002	НД
6 Черное море n=29	N t	НД	НД	НД	< 0,002	< 0,002		< 0,002
	D	< 0,002	< 0,002	НД	< 0,002	< 0,002		< 0,002
	H	< 0,002	НД	< 0,002	НД	< 0,002		НД
	S	НД	НД	< 0,002	НД	< 0,002		< 0,002
7 Куйбышевское вдхр n=29	N t	НД	НД	< 0,002	НД	< 0,002	< 0,002	
	D	НД	НД	< 0,002	НД	< 0,002	< 0,002	
	H	< 0,002	НД	< 0,002	< 0,002	< 0,002	НД	
	S	< 0,002	НД	< 0,002	< 0,002	НД	< 0,002	

*НД – нет достоверных различий.

Более изменчивым оказалось число лучей в спинном плавнике (D). Наименьшее среднее значение этого признака имели выборки Каспийского и Черного морей ($33,63 \pm 0,41$; $33,19 \pm 0,38$ соответственно), а также выборка из Днепровского лимана ($35,10 \pm 0,31$), средние числа лучей в спинном плавнике для других выборок (представленных, как правило, более крупными экземплярами) варьируют в пределах 37-39 лучей. Наибольшие значения индекса Животовского наблюдаются у выборок Куйбышевского водохранилища, Каспийского моря и Черноморского бассейна (Днепровский лиман, Дон, Таманский залив Черного моря), наименьшие - для выборок нижней Волги (Волгоградское водохранилище, дельта Волги, авандельта

Волги). Выборка из дельты Волги также характеризуется низким значением показателя Животовского для числа хвостовых колец (табл. 3).

Наблюдаются достоверные различия для некоторых выборок по признаку D. При попарном сравнении популяции Каспийского моря с популяциями Черноморского бассейна, достоверные различия по числу лучей в спинном плавнике были обнаружены только для выборки из Днепровского лимана (табл. 2).

Средние значения числа хвостовых поясков в различных выборках варьируют в пределах 37-39 колец. Для большинства особей из Каспийского и Черного морей число хвостовых колец (мода) равно 38, для Днепровского лимана этот показатель равен 37, для остальных же выборок 39. Возможно, как и в случае предыдущего признака наблюдается некоторое увеличение числа колец с размером особи.

Для всех меристических признаков наблюдается существенное перекрытие диапазонов значений между разными выборками.

Таблица 3. Значения показателя внутрипопуляционного разнообразия Животовского μ для различных счетных признаков в выборках иглы-рыбы *Syngnathus nigrolineatus*.

Станция	Np	Nt	D	P
Дельта Волги	1,8 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,3
Авандельта Волги	1	5,0 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,1
Каспийское море	1,9 $\pm$ 0,1	4,7 $\pm$ 0,6	7,1 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,3
Дон	1,5 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,0
Днепровский лиман	1,7 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,2
Черное море	2,4 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,2
Куйбышевское вдхр.	1,9 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 0,3
Волгоградское вдхр.	2,1 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,2

Для выявления отдельных групп популяций иглы рыбы *Syngnathus nigrolineatus* мы использовали метод главных компонент по признакам D, H, S. Первые две компоненты в сумме связали 91 % суммарной дисперсии исследуемых признаков (табл. 4). На рис. 2 показано распределение рыб из разных выборок в пространстве двух компонент. Хотя явная обособленность рыб какой-либо из выборок не наблюдается, видно что, рыбы из Каспийского моря в основном несколько удалены от остальных и расположены в левой верхней части распределения, а рыбы из Черного моря – в нижней части распределения. Остальные же выборки образуют единое облако без какой-либо ясной структуры.

Таблица 4. Собственные значения главных компонент для признаков D, H, S.

Параметр	1-ая компонента	2-ая компонента	3-я компонента
Собственное значение	1,40	0,87	0,52
Кумулятивный вклад главных компонент в суммарную дисперсию (%)	65,46	90,97	100,00

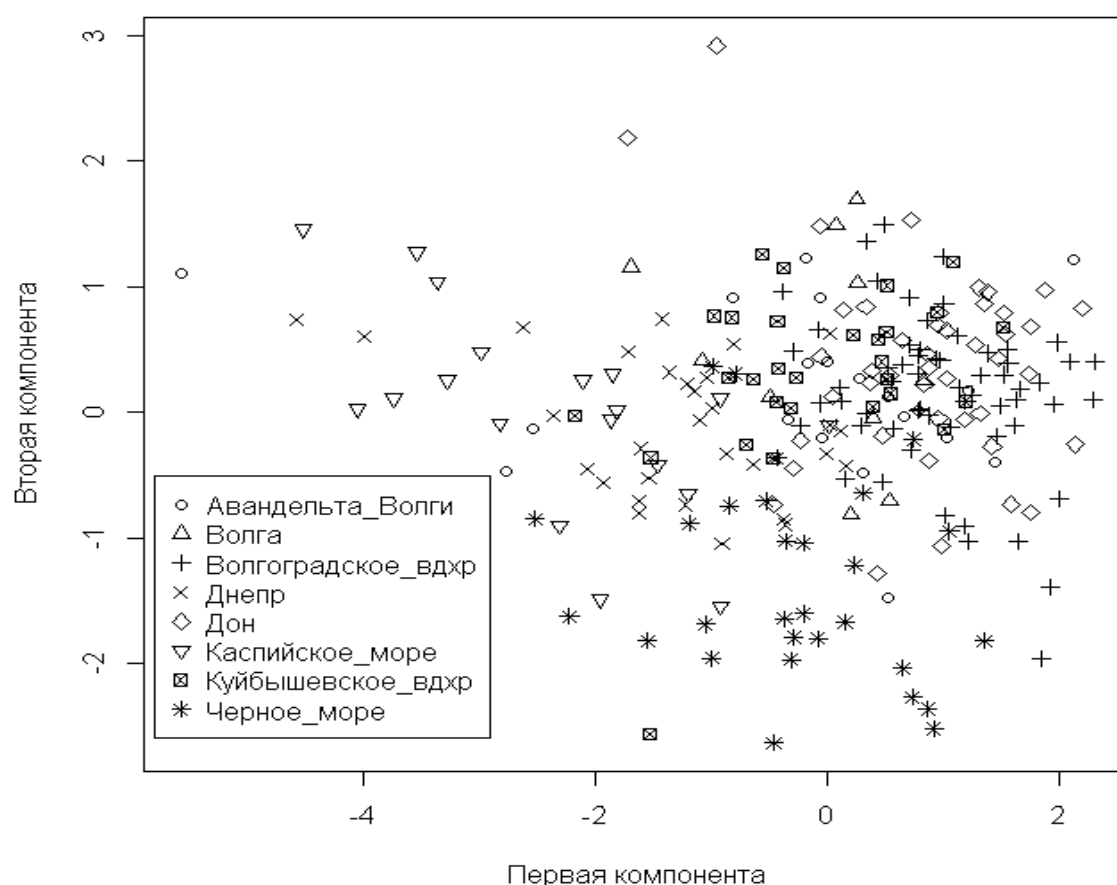


Рис. 7 Распределение выборок иглы-рыбы в пространстве двух главных компонент по признакам H, S, D.

Ни один из изученных признаков не подходит для определения принадлежности образца к одному из подвидов, а также для установления происхождения волжских популяций, поскольку существует значительное перекрытие диапазонов значений признаков между выборками. Отношение длины рыла к длине тела и длины головы к длине тела в среднем несколько выше для рыб из популяции Каспийского моря. Достоверных различий по

числу лучей в спинном плавнике и количеству хвостовых поясков между популяциями Черного и Каспийского морей не найдено. Анализ главных компонент по трем признакам (H, S, D) не позволил выявить отдельные группы популяций.

*Раздел 2. Генетическая изменчивость в различных популяциях *Syngnathus nigrolineatus*. Пути и источники инвазии в водоемы бассейна Волги.*

Нами были получены последовательности фрагмента гена цитохрома b (507 п.н.) и фрагмента контрольного региона (560 п.н.) мтДНК *S. nigrolineatus* (N=139) и *S. typhle* (N=3). Для контрольного региона было обнаружено 70 полиморфных сайтов и 5 однонуклеотидных вставок/делеций (indel), две вставки в основном характерны для выборки из Каспийского моря. Для гена цитохрома b было найдено 53 вариабельных сайта.

В таблицах 5 и 6 приведены данные по нуклеотидному и гаплотипическому разнообразию для обоих маркеров. Почти все выборки характеризуются меньшим уровнем изменчивости по фрагменту гена цитохрома b, что связано с тем, что ген цитохрома b является белок-кодирующим и более консервативным, в отличие от некодирующего и более изменчивого контрольного региона.

Таблица 5. Нуклеотидное разнообразие в различных популяциях *Syngnathus nigrolineatus*.

Выборка	N	Контрольный регион		Ген цитохрома b	
		S	π	S	π
Куйбышевское вдхр.	22	5	0.0012±0.0004	7	0.0027±0.0009
Волгоградское вдхр.	19	9	0.0021±0.0007	6	0,0018±0.0005
Дельта Волги	11	2	0.0018±0.0004	1	0.0010±0.0002
Авандельта Волги	16	33	0.0152±0.0028	15	0.0092±0.0023
Каспийское море	14	15	0.0065±0.0010	20	0,0078±0.0020
Черное море	31	19	0.0040±0.0007	12	0,0029±0.0005
Днепровский лиман	24	8	0.0034±0.0006	7	0.0012±0.0006

Примечание: S – число полиморфных сайтов, π – нуклеотидное разнообразие

Наибольшим уровнем нуклеотидного разнообразия по обоим маркерам характеризуется выборка из авандельты Волги, причем нуклеотидное разнообразие по контрольному региону на порядок превышает значения этого показателя для других выборок, также по этому маркеру для выборки из Авандельты характерно наибольшее число полиморфных сайтов. На втором месте по этому показателю стоит выборка из Каспийского моря. В

волжских популяциях (Куйбышевское и Волгоградское водохранилища, дельта Волги) наблюдается самый низкий уровень нуклеотидного разнообразия, в частности по гену цитохрома b наименьшей изменчивостью обладает выборка из дельты Волги, а по контрольному региону – выборка из Куйбышевского водохранилища. Выборка из Черного моря характеризуется более низким уровнем нуклеотидной изменчивости в сравнении с выборкой Каспийского моря.

Нами было описано 46 гаплотипов для фрагмента гена цитохрома b и 57 гаплотипов для фрагмента контрольного региона.

Для контрольного региона было найдено 6 «неуникальных» гаплотипов (встречающихся более чем в одной популяции), гаплотип (h1) встречается во всех популяциях, кроме Волгоградского водохранилища и Каспийского моря. Гаплотипы (h2, h3) являются общими для популяций черноморского бассейна и волжских водохранилищ. В популяции Каспийского моря найден единственный «неуникальный» гаплотип (h6) общий с популяцией авандельты Волги. Гаплотипическое разнообразие по контрольному региону более высокое для популяций авандельты Волги, Черного и Каспийского морей, Днепровского лимана.

Для фрагмента гена цитохрома b было описано 3 «неуникальных» гаплотипа. Гаплотипы a1 и a2 встречаются во всех популяциях кроме Каспийского моря, в популяции Дона встречается только a2. Также единственный «неуникальный» гаплотип a3 популяции Каспийского моря является общим с популяцией авандельты Волги. Показатели гаплотипического разнообразия максимальны для популяций авандельты Волги, Черного и Каспийского морей.

Таблица 6. Гаплотипическое разнообразие в различных популяциях *Syngnathus nigrolineatus*.

Выборка	N	Nh1	Hd1	Nh2	Hd2
Куйбышевское вдхр.	22	5 (0,23) h1,h2,h3	0,468±0,015	6(0,27) a1,a2	0,580±0,111
Волгоградское вдхр.	19	7 (0,36) h2,h3	0,544±0,136	6 (0,32)a1,a2	0,658±0,096
Дельта Волги	11	2 (0,18) h1,h5	0,509±0,101	2 (0,18)a1,a2	0,509±0,101
Авандельта Волги	16	13 (0,81) h1,h5,h6	0,967±0,036	7 (0,43)a1,a2,a3	0,741±0,105
Каспийское море	14	12(0,86) h6	0,978±0,119	10(0,71) a3	0,890±0,081
Черное море	31	19 (0,61)h1,h2,h3,h4	0,938±0,027	12 (0,38)a1,a2	0,809±0,061
Днепровский лиман	24	8 (0,33)h1,h3,h4	0,801±0,052	6 (0,25) a1,a2	0,380±0,125
Дон	2	1 (0,5) h1	0,000	2 (1,0) a2	1,000±0,500
-	139	N=57	-	N=46	-

Примечание: Nh - количество гаплотипов, в скобках число гаплотипов взвешенное на объем выборки; h1-h6, a1-a3 – общие гаплотипы; Hd – гаплотипическое разнообразие, 1 – контрольный регион, 2 – ген цитохрома b.

В целом и гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие снижено в популяциях водохранилищ и дельты Волги в сравнении с остальными.

Для установления степени родства между гаплотипами были построены сети гаплотипов (рис. 3, рис. 4). Полученные сети гаплотипов имеют схожую структуру по обоим маркерам. Выделяются два кластера «каспийский» и «черноморский» отстоящие друг от друга на 8 нуклеотидных замен по контрольному региону и на 7 нуклеотидных замен по гену цитохрома b. К каспийскому кластеру принадлежат особи из каспийской популяции, а также несколько образцов из авандельты, а «черноморский» кластер включает в себя представителей оставшихся выборок. Оба кластера имеет звездчатую структуру (особенно заметную на сети построенной для гена цитохрома b), в центре расположены общие гаплотипы, вокруг которых группируются все остальные.

Инвазионные популяции волжских водохранилищ на сетях оказываются родственны черноморским популяциям и даже имеют общие гаплотипы (см. также рис. 5). Интересно, что популяция из дельты Волги также принадлежит к «черноморскому» кластеру. Возможно, она могла образоваться при вторичной инвазии из водохранилищ вниз по Волге. Сходная ситуация наблюдается и для некоторых других видов, недавно закрепившиеся в волжских водохранилищах ракообразные *Cornigerius* и *Cercopagis* на основании данных мтДНК оказались также близки черноморским выборкам, а не каспийским (Cristescu, 2003). С другой стороны «черноморские» гаплотипы могли проникнуть в дельту Волги во время одного из контактов Черного и Каспийского морей (время последнего контакта: ~16000 лет назад (Bahr, 2005)). Авандельта Волги содержит гаплотипы принадлежащие и к «черноморскому» и к «каспийскому» кластерам, что объясняет повышенное генетическое разнообразие в этой локальности.

По составу и частотам «неуникальных» гаплотипов популяции Волги отличаются друг от друга и от черноморских популяций (особенно на примере контрольного региона) (рис. 3). Так, в популяции Куйбышевского водохранилища самый распространенный гаплотип для фрагмента контрольного региона h1, в Волгоградском водохранилище – h3. Выборка из дельты Волги содержит гаплотипы h1 и h5 (контрольный регион), последний из которых кроме данной локальности встречается только в авандельте.

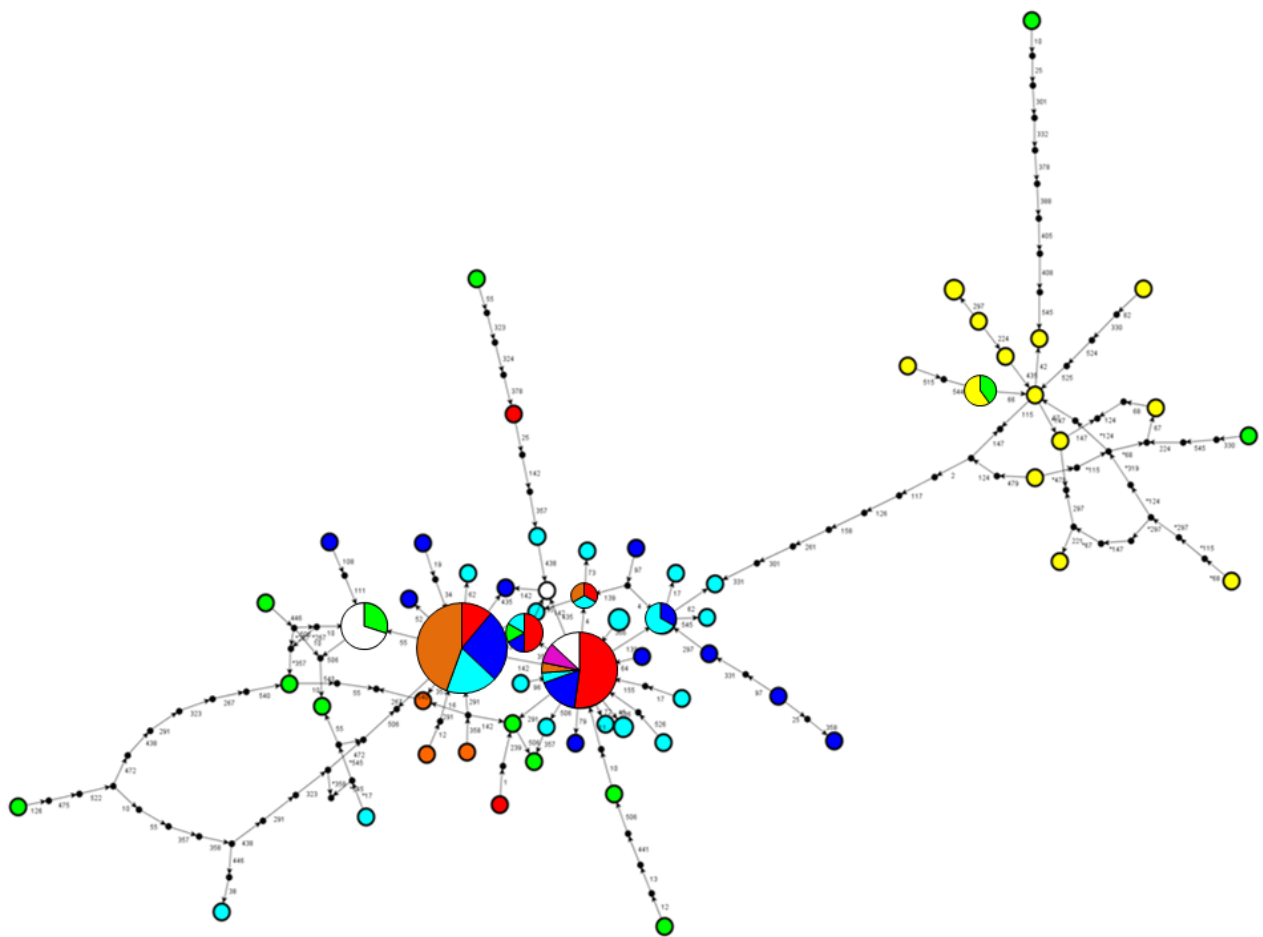


Рис. 3. Парсимониальная сеть гаплотипов *S. nigrolineatus* из бассейнов Черного и Каспийского морей на основании фрагмента контрольного региона. Желтые круги – Каспийское море, зеленые – авандельта Волги, белые – дельта Волги, красные – Куйбышевское и оранжевые – Волгоградское водохранилища, голубые – Черное море, розовые – Дон, синие – Днепровский лиман, черные – гипотетические промежуточные гаплотипы. Размеров круга пропорционален числу особей с данным гаплотипом.

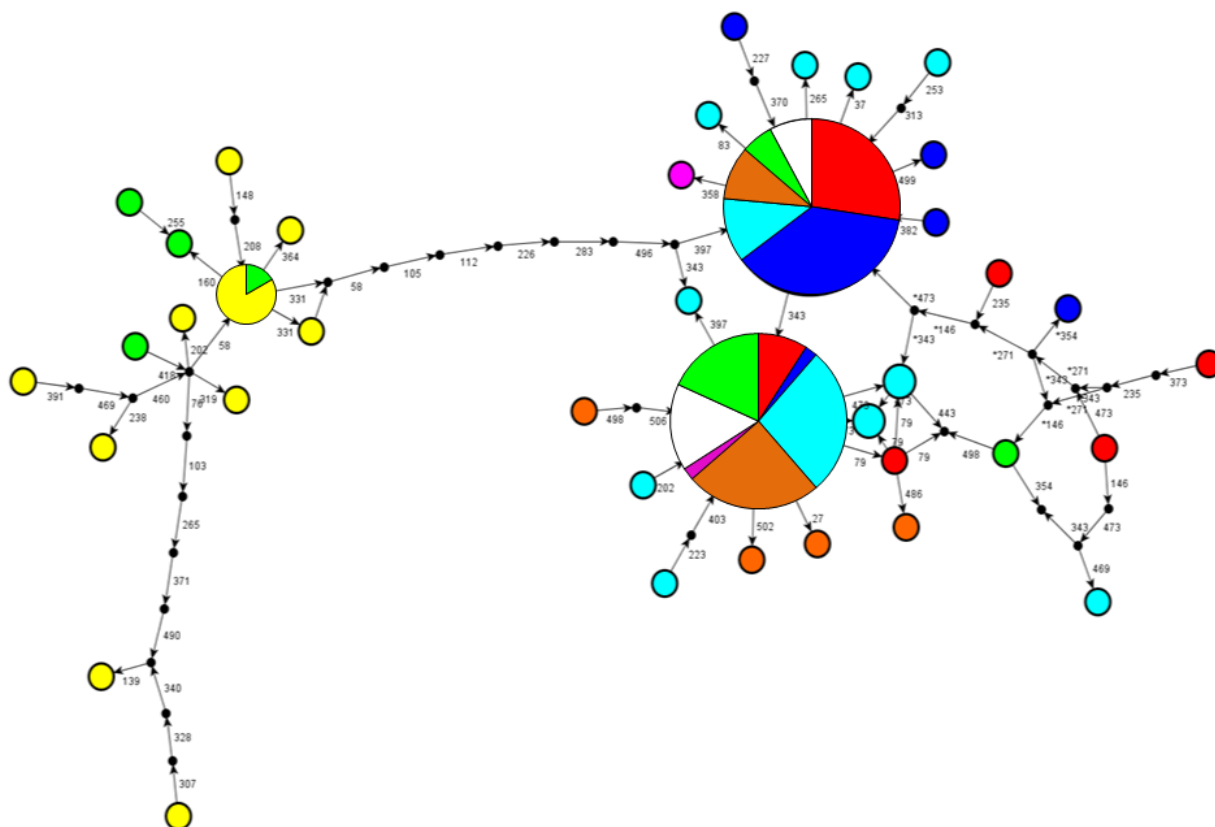


Рис. 4. Парсимониальная сеть гаплотипов *S. nigrolineatus* из бассейнов Черного и Каспийского морей на основании фрагмента гена цитохрома b. Обозначения те же, что и на рис. 1.

В качестве меры дифференциации популяций мы использовали парные индексы F_{st} , а для проверки гипотезы об идентичном распределении гаплотипов среди популяций использовался тест Рэймонда и Роуссета (Raymond, Rousset, 1995) (табл.7) (индексы F_{st} и тест Рэймонда и Роуссета были посчитаны для объединенных фрагментов гена цитохрома b и контрольного региона (1067 п.н)). Тест Рэймонда и Роуссета показал значимые различия в распределении гаплотипов между всеми парами выборок. Популяция Каспийского моря наиболее «удалена» от остальных. Большие индексы F_{st} между каспийской и остальными выборками (кроме Авандельты) ($F_{st} > 0,75$; $P < 0,001$) говорят о ее изоляции. Генетическая «дистанция» между каспийской популяцией и авандельтой несколько ниже, что отражает присутствие родственных гаплотипов в обеих популяциях. Более низкие, но достоверные значения F_{st} для других пар популяций свидетельствуют о существовании ограниченного потока генов между этими популяциями. Для популяций дельты Волги и Авандельты Волги индекс F_{st} низкий и недостоверный, что отражает присутствие общих гаплотипов, эти локальности расположены ближе друг к другу, и при расселении рыбы иглы

из водохранилищ дельта Волги занимает промежуточную точку на пути к Авандельте.

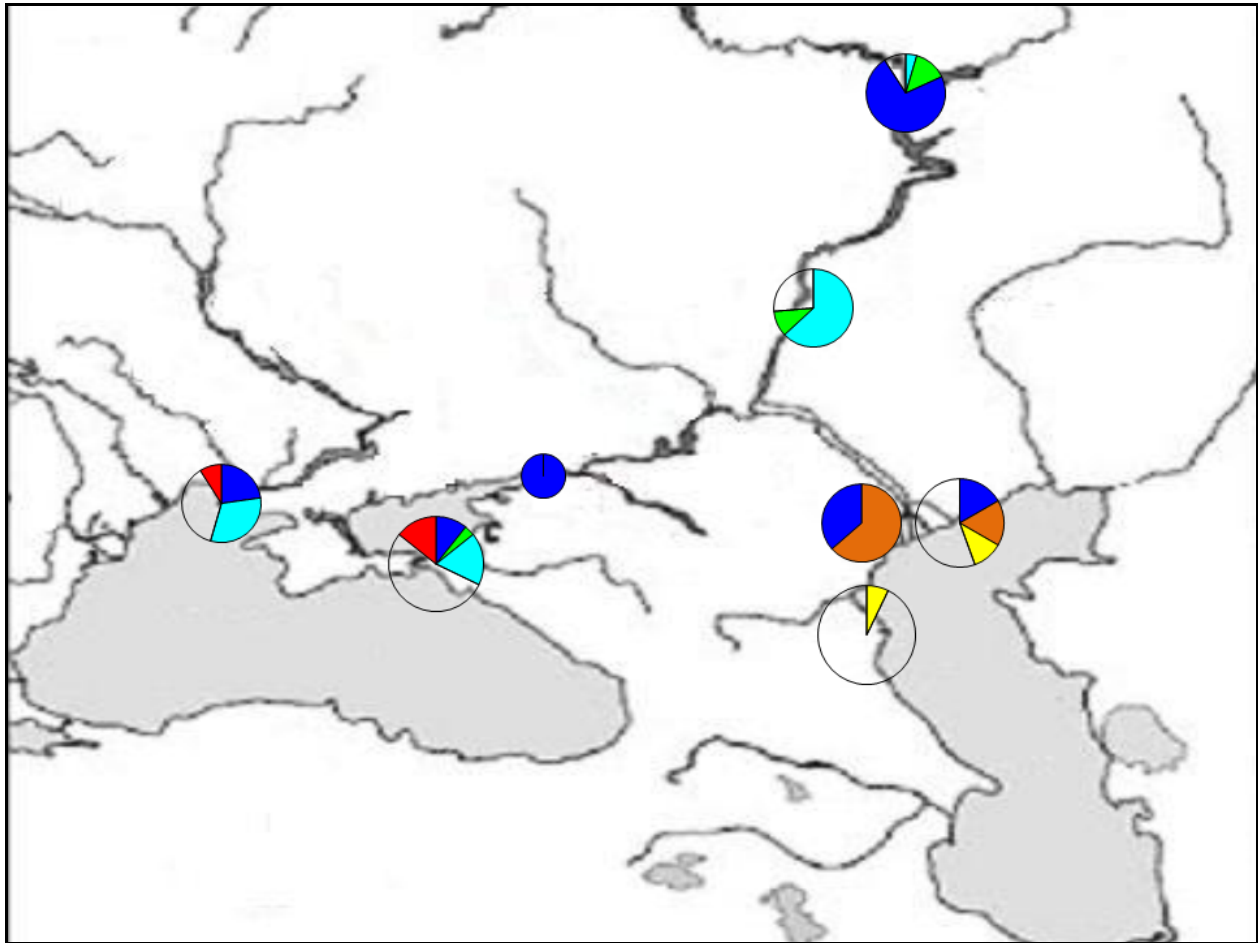


Рис. 5. Распределение общих гаплотипов в различных популяциях *S. nigrolineatus* (на основании фрагмента контрольного региона). Незакрашенная часть круга отражает долю уникальных (характерных только для этой популяции) гаплотипов. Синим обозначен гаплотип h1, зеленым – h2, голубым – h3, красным – h4, оранжевым – h5, желтым – h6

Таблица 7. Парные генетические расстояния между популяциями *S. nigrolineatus* на основании объединенных фрагментов гена цитохрома b и контрольного региона (1067 п.н).

Локальность	КУБ	ДНЕ	АВА	ВЛГ	ВОЛ	ДАГ	ЧЕР
КУБ		***	***	***	***	***	+
ДНЕ	0.086**		***	***	**	***	***
АВА	0.168***	0.176***		***	+	+	**
ВЛГ	0.250***	0.263***	0.158***		***	***	***
ВОЛ	0.240***	0.246***	0.081	0.151**		***	***
ДАГ	0.793***	0.771***	0.478***	0.805***	0.782***		+
ЧЕР	0.052**	0.106***	0.147***	0.099***	0.107**	0.764***	

Примечание: В таблице под диагональю приведены индексы Fst, над диагональю результаты теста Рэймонда и Роуссета (+ найдены значимые отличия в распределении

гаплотипов, – нет значимых отличий), звездочками указан уровень значимости: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Поправка на множественные сравнения не вводилась. Названия выборок приведены в соответствие с таблицей 1.

Для уточнения филогенетических отношений между каспийским и черноморским подвидами *S. nigrolineatus* мы построили деревья гаплотипов для объединенных фрагментов гена цитохрома b и контрольного региона (1067 п.н) на основании байесовского анализа (BI), а также с помощью методов максимального правдоподобия (ML). Топология деревьев, построенных разными методами, не имела принципиальных различий. На дереве выделяются два кластера с высокой степенью поддержки, соответствующие каспийским и черноморским гаплотипам *S. nigrolineatus*, что говорит о генетической обособленности подвидов иглы-рыбы.

Раздел 2. Родство *S. nigrolineatus* со средиземноморскими иглами *S. abaster*.

Для изучения степени родства со средиземноморскими иглами мы взяли последовательности фрагментов гена цитохрома b и контрольного региона *S. abaster* из базы Генбанк, проанализированные в недавней статье Sanna et. al (2013) (см. табл. 5). Далее для анализа мы использовали объединенный участок мтДНК (ген цитохрома b, контрольный регион) длиной 750 п.н..

Мы посчитали генетические дистанции (p) между различными группами *S. abaster* и подвидами *S. nigrolineatus*, для сравнения была также взята *S. typhle* (табл. 9). Максимально удаленным от остальных группировок оказался туниcский кластер *S. abaster* (T) (в таблице значения выделены жирным шрифтом), на втором месте по удаленности стоит итальянский кластер *S. abaster* (I) (в таблице значения выделены курсивом), западный кластер *S. abaster* (W) и подвиды *S. nigrolineatus* отстоят друг от друга на примерно одинаковые расстояния. Интересно, что найденное нами наименьшее расстояние – между *S. typhle* и *S. abaster* W, чуть дальше отстоят подвиды *S. nigrolineatus* (причем расстояние между подвидами примерно такое же, как и расстояния от них до *S. typhle*). На сетях гаплотипов и деревьях (не приводится в автореферате) *S. typhle* также входит в один кластер с *S. abaster* W (рис. 6). Интересно, что в статье Санна (Sanna et. al., 2013) аналогичная ситуация с *S. taenionotus*, которая на сетях и деревьях кластеризуется вместе с западной группой *S. abaster* (W), что может говорить о полифилии *S. abaster*. Причиной поли- или парафилии может быть несовершенная таксономия, гибридизация, неполная сортировка линий во время видообразования.

Табл. 8. Последовательности *S. abaster* взятые из базы Генбанк. (Информация о группах *S. abaster* и местах сбора взята из статьи Санна (Sanna et al., 2013))

Группа	Место поимки	ID Genbank
<i>S. abaster</i> W	Корсика	cyt b:JF306532,33, 35,36
		D-loop: JF306423,24,26,27
	Франция (Лангедок – Руссильон)	cyt b:JF306558-61
		D-loop:JF306450-53
	Испания (Ла Манга)	cyt b:JF306581,82,84
		D-loop:JF306472,73,75
<i>S. abaster</i> I	Италия (Лацио)	cyt b:JF306619,29
		D-loop: JF306510,20
	Италия (Тоскана)	cyt b:JF306631,33,35,37
		D-loop: JF306522,24,26,28
	Венеция	cyt b: JF306607,9,11,13,14,17
		D-loop: JF306498,00,02,04,05,08
<i>S. abaster</i> T	Тунис 1	cyt b:JF306594,95,97,99
		D-loop: JF306485,86,88,00
	Тунис 2	cyt b:JF306600,03,04
		D-loop: JF306490,93,94

Таблица 9. Парные генетические дистанции между различными группами *S. abaster*, подвидами *S. nigrolineatus* и *S. typhle*.

Группа	<i>S. typhle</i>	<i>S. abaster</i> W	<i>S. abaster</i> I	<i>S. abaster</i> T	<i>S. n.</i> <i>Nigrolineatus</i>
<i>S. typhle</i>					
<i>S. abaster</i> W	0.015±0.004				
<i>S. abaster</i> I	0.040±0.007	0.036±0.006			
<i>S. abaster</i> T	0.062±0.009	0.062±0.008	0.056±0.008		
<i>S. n. nigrolineatus</i>	0.024±0.005	0.023±0.005	0.038±0.006	0.064±0.009	
<i>S. n. caspius</i>	0.029±0.005	0.026±0.005	0.038±0.006	0.066±0.009	0.028±0.005

На медианных сетях гаплотипов выделяются 5 кластеров соответствующих 3 группировкам *S. abaster* и 2 подвидам *S. nigrolineatus*. Самой близкой к подвидам *S. nigrolineatus* оказывается западная группа *S. abaster* W.

Сеть парсимонии выявила 5 несвязанных кластеров соответствующих описанным выше, поскольку связи между кластерами были незначимы.

Байесовское дерево (не приводится в автореферате) было укоренено *S. abaster* T, поскольку полученная в результате топология (где кластер *S. abaster* T внешний по отношению к кластеру, включающему *S. abaster* W и *S. abaster* I) характерна и для укорененного дерева *S. abaster* по данным Санна (Sanna, 2013). На дереве также выделяются 5 группировок с высокой

степенью поддержки. Таким образом, группировки *S. abaster* и подвиды *S. nigrolineatus* представляют собой изолированные генетические группы. Однако принимая во внимание возможные недостатки использования маркеров мтДНК (Ballard & Whitlock, 2004), для более строгих обобщений желательно дополнить исследование данными по ядерным маркерам и возможно, дополнительными маркерами мтДНК, а также построить дерево, укорененное видом, не принадлежащим к комплексу *S. abaster*.

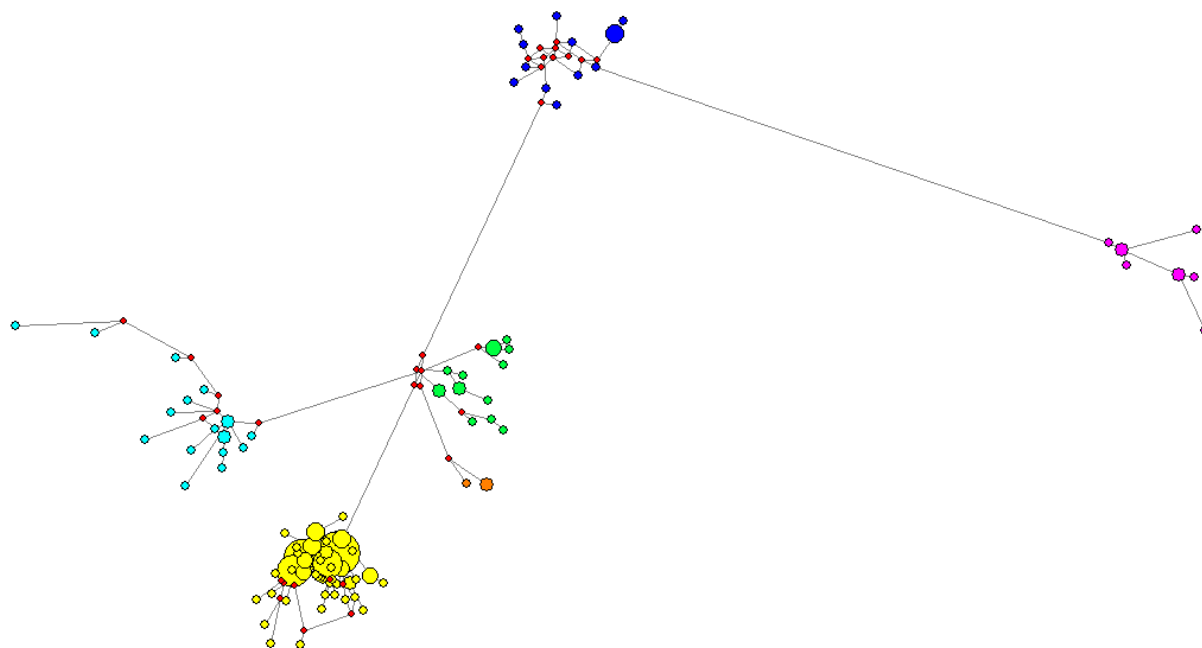


Рис. 6. Медианные сети гаплотипов *S. nigrolineatus*, *S. abaster*, *S. typhle* на основании мтДНК (750 п.н.). Желтые круги – *S. nigrolineatus nigrolineatus*, голубые – *S. nigrolineatus caspius*, зеленые – *S. abaster* W, оранжевые – *S. typhle*, синие – *S. abaster* I, сиреневые – *S. abaster* T, красные – гипотетические промежуточные гаплотипы. Размеров круга пропорционален числу особей с данным гаплотипом, длина линий соединяющих гаплотипы пропорциональна числу мутаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было показано на основании анализа мтДНК, что иглы-рыбы волжских водохранилищ и дельты Волги близки к черноморским иглам-рыбам. Присутствие в дельте и авандельте Волги черноморских гаплотипов может свидетельствовать о продолжающемся расселении иглы-рыбы из волжских водохранилищ или же является результатом проникновения черноморских гаплотипов во время последнего контакта Каспийского и Черного морей. Проведенный анализ доказал существенную степень генетической дивергенции «каспийской» и «черноморской» групп *S. nigrolineatus*. Для исследованных нами морфологических признаков мы не

нашли распределений с хиатусом, тем не менее мы наблюдали достоверные различия между некоторыми выборками по ряду признаков. Несмотря на отсутствие ярких морфологических отличий между каспийскими и черноморскими рыбами, возможно существует разница в экологии подвидов: по рекам распространяется только черноморский подвид *S. nigrolineatus*. С точки зрения науки о биологических инвазиях разница в экологии подвидов и их способности осваивать новые биотопы, делает *S. nigrolineatus* модельным объектом для исследования генетических факторов, связанных с успешной колонизацией пресноводных биотопов.

Три группы *S. abaster* и подвиды *S. nigrolineatus* представляют собой изолированные генетические группы. В литературе описано, что для видов населяющих прибрежные морские воды, немигрирующих на далекие расстояния и не имеющих планктонной стадии в жизненном цикле характерна сложная популяционная структура. В условиях изоляции отдельные популяции демонстрируют высокую степень дивергенции друг от друга и видообразование может происходить в относительно короткие сроки.

ВЫВОДЫ

1. По данным полученным для обоих маркеров (ген цитохрома b, контрольный регион) популяции Каспийского и Черного морей *S. nigrolineatus* представляют генетически обособленные группы

2. Исследованные популяции *S. nigrolineatus* Куйбышевского и Волгоградского водохранилищ иглы-рыбы генетически близки к популяциям бассейна Черного моря и, вероятно, происходят от них. Вероятно, из водохранилищ произошло вторичное заселение низовьев Волги. В данный момент в авандельте Волги сосуществуют «каспийские» и «черноморские» гаплотипы.

3. Выборки волжских водохранилищ и дельты Волги характеризуется сниженным генетическим разнообразием. Наибольшим генетическим разнообразием характеризуется выборка из Каспийского моря и авандельты Волги. Повышенное разнообразие выборки из авандельты Волги отчасти связано с присутствием в ней одновременно «каспийских» и черноморских» гаплотипов игл-рыб.

4. Выборки иглы-рыбы из бассейна Волги отличаются от выборок Черного моря и друг от друга по составу и частотам «неуникальных» гаплотипов контрольного региона мтДНК.

5. На основании анализа мтДНК три группировки средиземноморских *S. abaster* (тунисская, западно-средиземноморская и итальянская), *S. nigrolineatus nigrolineatus*, *S. nigrolineatus caspius* представляют собой обособленные генетические группы. *S. typhle* входит в один кластер с западно-средиземноморской группировкой *S. abaster*.

6. Выборка из Каспийского моря значительно отличается по индексам отношения длины головы к длине тела и длины рыла к длине тела от всех исследованных выборок, кроме выборки из Днепровского лимана. По

средним значениям этих признаков выборки из бассейна Волги ближе к выборкам Черного моря.

7. Для количества лучей в спинном плавнике не найдено значимых отличий между выборками Черного и Каспийского морей, в то время как обе морские выборки отличаются от выборок бассейна Волги с высоким уровнем значимости.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах и других изданиях ВАК

Кирюхина Н.А., М. В. Холодова Анализ полиморфизма контрольного региона митохондриальной ДНК в аборигенных и инвазийной популяциях черноморской пухлощеклой иглы рыбы *Syngnathus nigrolineatus* Eichwald 1831 // Доклады Академии Наук. 2011. Т. 436 №6 С. 1-3

Кирюхина Н.А. Морфологическая изменчивость пухлощеклой иглы-рыбы *Syngnathus nigrolineatus* в связи с ее инвазией в водоемы бассейна Волги // Российский журнал биологических инвазий. 2013. № 2. С. 149-155.

Кирюхина Н.А. Молекулярно-генетическое разнообразие в популяциях иглы-рыбы *Syngnathus nigrolineatus* Eichwald 1831 и пути расселения в водоемы бассейна Волги на основании анализа последовательностей митохондриальной ДНК // Российский журнал биологических инвазий, 2013, № 3. С. 60-69.

Статьи в сборниках

Кирюхина Н.А. Оценка генетического разнообразия и степени генетического сходства аборигенных и инвазионной популяций пухлощеклой иглы-рыбы (*Syngnathus nigrolineatus*) на основании фрагмента цитохрома б митохондриальной ДНК // Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых, 2010 С. 156 -162.

Кирюхина Н.А., Дгебуадзе Ю.Ю. Исследование молекулярно-генетической изменчивости в аборигенных и инвазионной популяциях черноморской пухлощеклой иглы-рыбы *Syngnathus nigrolineatus* Eichwald 1831 на основании фрагментов цитохрома b и контрольного региона мтДНК // Генофонды и генетическое разнообразии. М.: 2011. С. 93-94.

Тезисы конференций

Kiryukhina N.A. Genetic variability in the pipefish *Syngnathus nigrolineatus* invasive and aboriginal populations based on mtDNA sequence data // 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. Yaroslavl: Print-House Publ. Co. p. 54.