

Лебедева Елена Борисовна

**Структура и распространение
клонально-бисексуальных комплексов рыб
р. *Cobitis* (Cobitidae)**

03.00.10 - ихтиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2007

Работа выполнена в Институте проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН.

Научный руководитель

доктор биологических наук,
Виктор Павлович Васильев
Институт проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова, г. Москва

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
Виктор Николаевич Михеев
Институт проблем экологии и эволюции
им. А. Н. Северцова, г. Москва

кандидат биологических наук,
Александр Витальевич Рекубрятский
Всероссийский научно-исследовательский
институт пресноводного рыбного хозяйства
(ВНИИПРХ), пос. Рыбное, Дмитровского р-на,
Московской области

Ведущая организация

**Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова
РАН, г. Москва**

Защита состоится «26 » декабря 2007 года в 14 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.213.02 при Институте проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, по адресу:
119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, телефон/факс (495) 952-35-84.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения общей биологии РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33

Автореферат разослан « 26 » ноября 2007 года.

Ученый секретарь Совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук

Т. П. Крапивко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Открытие клональных форм позвоночных привело к развитию новых направлений эволюционно-генетических, цитологических и экологических исследований, которые можно объединить в четыре основных блока: происхождение клональных форм, цитогенетические механизмы клонального наследования, клональное разнообразие и его источники, экологические проблемы сосуществования клональных и бисексуальных форм. Важнейшие результаты этих исследований - доказательство гибридного происхождения клональных форм и понимание эволюционной взаимосвязи гибридизации, однополого размножения и полиплоидии - привели к развитию концепции сетчатого видообразования у позвоночных (Боркин, Даревский, 1980, Васильев, 1985) и доказательству того, что конечным этапом этого процесса может быть возникновение четноплоидных видов с восстановленной бисексуальностью (Васильев и др., 1983, Vasil`ev et al., 1989). К настоящему времени среди рыб, амфибий и рептилий обнаружено около 85 форм, которые представлены только самками и размножаются путем партеногенеза, гиногенеза и гибридогенеза. В отличие от партеногенеза, встречающегося в некоторых группах рептилий (Vrijenhoek et al., 1989), при естественном гиногенезе необходимы самцы, спермии которых стимулируют развитие яйцеклеток, при этом истинного оплодотворения не происходит. В связи с этим гиногенетические формы рыб и амфибий обитают совместно с одним или двумя близкородственными бисексуальными видами, в результате гибридизации которых они возникли. В более редких случаях клональные формы для своего размножения используют самцов третьих менее близкородственных бисексуальных видов. Таким образом гиногенез клональных форм приводит к возникновению однополо-двуполых (клонально-бисексуальных) комплексов. Клонально-бисексуальные комплексы представляют достаточно обособленные эколого-генетические системы, функционирование которых в значительной степени зависит от клонального разнообразия однополых форм и состава комплексов. В связи с этим исследование однополо-двуполых комплексов представляет особый интерес и дает уникальные возможности для выяснения экологических и генетических отношений форм и видов, образующих комплексы. Кроме этого клональные формы, благодаря сохранению своей генетической структуры в ряду поколений, интересны для решения многих общебиологических проблем: характер наследования тех или иных признаков, эволюционная экология однополых форм и др.

Настоящая работа посвящена изучению распространения и состава клонально-бисексуальных комплексов р. *Cobitis* в различных водных бассейнах России и выяснению клональной структуры однополых форм комплексов. В последнем случае впервые для рыб р. *Cobitis* был использован метод ДНК-фингерпринтинга, который является наиболее эффективным для идентификации клонов.

Цели и задачи исследования. Основной целью работы было выявление особенностей распространения клонально-бисексуальных комплексов р. *Cobitis*, определение структуры комплексов из различных регионов, включая выяснение генетической структуры клональных форм. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выяснить особенности распространения комплексов, как в пределах европейской части России, так и в пределах отдельных водных бассейнов.
2. Определить состав комплексов (видовой состав, число однополых и полиплоидных форм), выявить относительную численность форм в однополо-двуполых комплексах.
3. С помощью мультилокусного ДНК-фингерпринтинга с использованием различных мини- и микросателлитных зондов определить клональную структуру однополых форм.
4. Рассмотреть эколого-генетические аспекты сосуществования клональных и бисексуальных форм.

Научная новизна и практическое значение работы. Впервые проведены широкие исследования по распространению клонально-бисексуальных комплексов щиповок в водоемах России, установлены восточная и южная границы распространения таких комплексов. Показано, что в пределах отдельных речных бассейнов клональные формы занимают более узкие ареалы, чем бисексуальные. Впервые показано, что относительная численность клональных и бисексуальных форм связана с особенностями происхождения клональных форм. В ходе проведения исследований обнаружены ранее неизвестные и уникальные по своему составу однополо-двуполые комплексы. Впервые получены данные по клональному составу однополых форм: показано, что некоторые клональные формы представлены единственным клоном, тогда как другие могут состоять из нескольких клонов. Получены оценки внутри- и межклонального разнообразия. Показано, что поликлональность форм связана с происхождением однополой формы от нескольких самок, тогда как моноклональность обусловлена географической монофилией или отбором клонов и выживанием одного клона.

Знания, полученные в ходе исследования генетической структуры клональных форм, могут быть использованы при разработке технологии регуляции пола у рыб.

Полученные данные вносят существенный вклад в общие знания о природе биоразнообразия, экологии и охране однополых видов позвоночных, а также о возникновении и происхождении однополых форм и новых видов.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на пяти конференциях: 2-й Международной конференции “Loaches of the genus *Cobitis* and related genera” (г. Ольштын, Польша, 2002), 9-й Международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология- наука XXI века» (Пушино, 2005), отчетных конференциях по программе

фундаментальных исследований президиума РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека» (Москва, 2005, Москва, 2006), 3-й Международной конференции “Loaches of the genus *Cobitis* and related genera/ Biology, systematics, genetics, distribution, ecology & conservation” (г. Шибеник, Хорватия, 2006).

Публикации. По результатам диссертационных исследований опубликовано 10 работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах и 6 тезисов докладов и материалов конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав: обзор литературы, материалы и методы, основные результаты работы и обсуждение результатов, выводов и списка литературы. Текст диссертации изложен на _____ страницах, содержит 22 таблицы и 14 рисунков. Список литературы включает в себя 149 работ на русском и иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность руководителю диссертации д.б.н. В. П. Васильеву, а также чл.корр. РАН А. П. Рыскову, оказавшему существенную помощь в выполнении настоящей работы. Автор также признателен всем коллегам, которые участвовали в наших совместных исследованиях д.б.н. Е. Д. Васильевой, к.б.н. А. Е. Бобыреву, чл.корр. РАН Е. А. Криксунову и В. А. Бурменскому. Автор благодарит за помощь и ценные советы, дружескую атмосферу и взаимопонимание всех сотрудников лаборатории экологии низших позвоночных ИПЭЭ РАН и лаборатории организации генома Института биологии гена РАН. Большую признательность автор выражает проф. М. И. Шатуновскому за ценные советы и критические замечания в ходе выполнения работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

Эта глава содержит обзор литературы, посвященный следующим темам:

- способы размножения однополо-женских форм позвоночных,
- открытие однополых форм рыб,
- однополо-двуполые комплексы щиповок р. *Cobitis*.

К настоящему времени среди позвоночных (рыбы, амфибии и рептилии) известно около 85 однополых форм, представленных исключительно самками, которые размножаются с помощью партеногенеза, гиногенеза или гибридогенеза. В генетическом отношении партеногенез и естественный гиногенез представляют собой одно явление. При отсутствии истинного оплодотворения потомство партеногенетических и гиногенетических самок представляет собой клон. Формы, которые размножаются с помощью гибридогенеза, называют полуклональными, поскольку клонально наследуется только материнский геном,

тогда как отцовский геном избирательно элиминируется в процессе созревания яйцеклеток.

Исследования однополых форм и видов показали, что они могут быть диплоидными, триплоидными и тетраплоидными. Наиболее часто такие формы являются триплоидными, реже диплоидными и только в единичных случаях встречаются тетраплоидные. Если при партеногенезе самцы не принимают участие в размножении, то при гиногенезе и гибридогенезе участие самцов необходимо, поэтому все гиногенетические и гибридогенетические формы всегда обитают совместно с бисексуальными близкородственными видами, самцов которых они используют для своего размножения, что ведет к возникновению однополо-двуполых комплексов. Среди рыб подобные комплексы обнаружены в родах *Poecilia*, *Poeciliopsis* (Poeciliidae), *Fundulus* (Cyprinodontidae), *Menidia* (Atherinidae), *Phoxinus*, *Rutilus* (Cyprinidae), *Cobitis* (Cobitidae). Их структура может быть различной, но обязательными элементами комплексов являются хотя бы одна однополая форма и один диплоидный бисексуальный вид. Наиболее обычные ситуации - это комплексы, включающие диплоидную или триплоидную однополую форму и один диплоидный бисексуальный вид. Однако в ряде случаев комплексы могут быть более сложными и включать несколько однополых форм различной ploидности и более одного бисексуального вида. При этом триплоидные или тетраплоидные особи могут иногда возникать с небольшой частотой *de novo* в каждом поколении, благодаря тому, что иногда с низкой частотой может происходить истинное оплодотворение.

Наибольшее разнообразие комплексов и эволюционных ситуаций, связанных с ними, обнаружено в р. *Cobitis*. Это разнообразие значительно превосходит таковое во всех других группах позвоночных вместе взятых. Во-первых, только здесь обнаружен диплоидно-триплоидно-тетраплоидный комплекс, в котором одна из тетраплоидных форм представлена как самками, так и самцами, что позволило на фактическом материале обосновать гипотезу о восстановлении бисексуальности при достижении четно-полиплоидного уровня и возникновении таким способом четно-полиплоидных бисексуальных видов (Васильев и др., 1983, Vasil'ev et al., 1989). Во-вторых, только здесь найдены комплексы, в которых однополая форма представлена исключительно тетраплоидными самками (Васильев и др., 2005). В-третьих, только здесь наряду с однополо-двуполыми комплексами различной ploидности найдены пары диплоидных и тетраплоидных бисексуальных видов (Ojima, Nitotsumachi, 1969). В-четвертых, только в р. *Cobitis* встречаются комплексы, где в качестве бисексуальных видов, участвующих в размножении однополых форм, могут быть виды, которые не принимали участия в их образовании, что ставит широко обсуждаемую проблему сосуществования клональных и бисексуальных видов (Moore, 1984, Vrijenhoek, 1978, Schenck, Vrijenhoek, 1986) в иную плоскость. В-пятых, только здесь обнаружен совершенно оригинальный комплекс, где все четыре формы связаны единой системой размножения и в

котором диплоидные гибриды продуцируют диплоидные яйцеклетки, при оплодотворении которых возникают триплоиды, продуцирующие гаплоидные яйцеклетки (Kim, Lee, 1990, 1995, 2000). Таким образом, объекты этого рода представляют собой прекрасный материал для решения различных задач, связанных с клональностью, асексуальной и бисексуальной полиплоидией, эволюционной экологией однополо-двуполых комплексов и необычными системами размножения (генетическими системами) позвоночных. Род *Cobitis* - единственный род позвоночных, где возможно изучение полного цикла сетчатого видообразования. В других группах позвоночных, где известны клональные формы, можно наблюдать только отдельные этапы этого процесса.

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Глава содержит основные сведения по собранному и обработанному материалу, здесь описаны методы определения плоидности и методы молекулярно-генетического анализа, а также приемы статистической обработки данных фингерпринтного анализа.

Материал для данной работы был собран в 2001-2005 гг. в предположительных местах распространения однополо-двуполых комплексов р. *Cobitis*: в реках бассейна Волги (Москва, Ока, Сура и Еруслан) (бассейн Каспийского моря), в реках Большой и Малый Узень (бассейн бессточных озер в Казахстане), в р. Западной Двине (бассейн Балтийского моря), в р. Днепре (бассейн Черного моря), в р. Дону и его притоках Сосне, Лесном Воронеже, Северском Донце, Калитве и Маныче (бассейн Азовского моря) (рис.1).

Общее количество собранного и обработанного материала представлено в таблице 1.

Таблица 1. Общее количество собранного и обработанного материала (экз.)

Речной бассейн	Всего собрано	Размерный состав	Плоидность	Молекулярно-генетический анализ
бассейн Волги	1593	1085	843	124
а) р. Москва	1162	745	661	110
б) р. Ока	26	15	15	14
в) р. Сура	260	177	109	-
г) р. Еруслан	145	75	58	-
р. Малый Узень	187	73	34	-
бассейн Дона (рр. Дон, Сосна, Лесной Воронеж, Калитва, Северский Донец, Маныч)	226	198	147	90
р. Западная Двина	176	148	148	97
р. Днепр (верхнее течение)	91	84	84	80
Всего	2273	1588	1256	391

Предварительную обработку, количественный учет и измерения стандартной длины рыб проводили непосредственно на местах сбора материала. Если было невозможно выявить видовой статус рыбы по внешним признакам, делали хромосомные препараты, по которым затем определялась видовая принадлежность. В частности точное определение *C. taenia* и *C. rossomeridionalis* можно сделать только по кариотипам. Для определения уровня ploидности готовили препараты мазков крови.

Массовое определение ploидности особей проводили с использованием цитометрического анализа, связанного с измерением площади эритроцитов под микроскопом. Определение ploидности некоторых особей прямым способом – с помощью подсчета числа хромосом – позволило соотносить те или иные размеры эритроцитов с определенной ploидностью.

Молекулярно-генетический анализ проводили на образцах крови, взятой у щиповок непосредственно на местах отлова. При сборе крови взрослых особей в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА. ДНК из крови выделяли с помощью стандартного фенольно-хлороформного метода с использованием протеиназы К (Mathew; 1984). Образцы ДНК обрабатывали рестриктазой и проводили блот-гибридизацию с [³²P] – меченым зондом (Кан и др., 1998). Поскольку ДНК-фингерпринтный спектр зависит только от природы рестриктазы и зонда (Рысков, 1999), в работе использовали сочетания следующих рестриктаз: *Bsu* RI, *Mva* I, *Hinf* I и зондов: (GACA)₄, (GATA)₄, (GGCA)₄, (GGAT)₄, Jeffrey's core 33.15, (TCCTCT)₃, (CAG)₅, (TCC)₅, (CAC)₅, (TCT)₆, (AAT)₆, (TG)₉, (CT)₉.

Для статистической обработки данных фингерпринтного анализа полученные данные фингерпринтов представляли в виде бинарных матриц типа объект-признак, где строки соответствуют особям, а столбцы – уровням, на которых расположены маркерные фрагменты ДНК. Анализировали матрицы с помощью программ STATISTICA 6.0 и Microsoft Execl 2000. Индекс генетического сходства (S), полученный при попарном сравнении особей, рассчитывали по формуле (1):

$$S = \frac{2 * F_{ab}}{F_a + F_b} \quad (1),$$

где F_a и F_b - число считываемых фрагментов у особей a и b, а F_{ab} - число совпадающих фрагментов между фингерпринтами двух особей (Gilbert et al.; 1990). Индекс генетических различий (PD) определяли по формуле(2):

$$PD = 1 - S \quad (2),$$

где – (S) индекс сходства (Lynch; 1990).

ДНК-фингерпринтные фенотипические группы определяли с помощью иерархического кластерного анализа, как совокупность особей, имеющих отличия по одному и более фрагментам ДНК.

Глава III. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ.

Глава содержит основные результаты по характеру распространения и составу однополо-двуполоых комплексов, а также данные по клональной структуре однополых форм.

3.1. Распространение бисексуальных видов и однополо-двуполоых комплексов.

Для доказательства существования клонально-бисексуального комплекса в том или ином месте проводили следующие исследования: 1) определяли соотношения полов, 2) определяли уровень пloidности по размерам эритроцитов, 3) по данным ДНК-фингерпринтинга делали заключение о клональном наследовании тех или иных форм.

В табл. 2 представлены средние размеры эритроцитов разных видов и форм, которые позволяют судить об уровне пloidности. С помощью вышеуказанных анализов (см. главу II) сделаны выводы относительно характера распространения клональных форм и бисексуальных видов. Характер распространения клональных форм показан на рис. 1.

Таблица 2. Средние размеры эритроцитов у рыб разной пloidности

Вид/Форма	Количество исследованных особей	Средняя длина (станд.кв. откл), мкм	Средняя ширина (станд.кв. откл), мкм	Средняя площадь (станд.кв. откл), кв.мкм
Бассейн р.Суры				
тетрапloidная форма	5	18,96 (0,74)	10, 14 (0,37)	150,83(7,31)
трипloidная форма	17	15,48 (0,59)	10,05(0,46)	122,19(7,54)
<i>C.taenia</i>	70	12,69 (0,70)	8,70(0,51)	86,75(7,34)
<i>C.melanoleuca</i>	14	12,02 (0,49)	7,97(0,37)	75,17(4,88)
Бассейн р. Москвы и р. Оки				
тетрапloidная форма	83	19,44 (0,76)	10,74(0,45)	163,91(10,07)
трипloidная форма	241	16,21 (0,69)	9,81(0,46)	124,82(8,97)
<i>C.taenia</i>	14	12,39 (0,79)	8,68(0,40)	84,35(6,22)
<i>C.melanoleuca</i>	10	12,83 (0,77)	8,09(0,49)	81,36(4,25)
Бассейн р. Западной Двины				
трипloidная форма	40	15,38 (0,96)	9,92(0,52)	119,83(11,20)
<i>C.taenia</i>	17	12,32 (0,51)	8,58(0,59)	82,90(6,53)
Бассейн р.Днепра				
трипloidная форма	13	16, 11 (0,78)	10,26(0,38)	129,73(8,62)
<i>C.taenia</i>	29	12,12 (0,81)	8,25(0,61)	78,63(9,26)
Бассейн р. Дона				
тетрапloidная форма	7	18,50 (0,29)	10,05(0,42)	145,85 (5,47)
<i>C.rossomeridionalis</i>	32	13,32 (0,52)	8,65(0,39)	90,34(5,89)
<i>C.melanoleuca</i>	5	11,95 (0,48)	7,85(0,39)	73,49(3,85)



Рисунок 1.
 Места сбора материала и распространение бисексуальных видов и однополо-двуполых комплексов на обследованной европейской части России.

Условные обозначения:
 Серыми точками на карте отмечены места сбора материала в 2001-2005 гг.

- ◆ - *C.taenia*,
- - *C.melanoleuca*,
- * - *C.rossomeridionalis*,
- △ - триплоидная форма,
- - тетраплоидная форма

3.2. Состав однополо-двуполых комплексов.

Определение плоидности рыб и видового состава комплексов позволило установить структуру комплексов и относительную численность форм (табл. 3).

Таблица 3. Состав изученных клонально-бисексуальных комплексов щиповок рода *Cobitis*

Речной бассейн	Год	Бисексуальные виды			Полиплоидные формы		Соотношение полов в комплексе (♀ : ♂)	Соотношение форм (бис.дипл.: полипл.)	Общее количество
		<i>C. taenia</i>	<i>C. mel.</i>	<i>C. ross.</i>	3 n	4 n			
Москва	2001	1,6%	15,3%		71,4%	11,7%	4,7:1	1:4,9	614
	2002						5,1:1		115
	2003	4,3%	14,9%		63,4%	17,4%	2,8:1	1:4,2	167
	2004	0,0%	48,8%		39,0%	12,2%	1,3:1	1:1,1	41
	2005	0,0%	6,9%		72,4%	20,7%	5,5:1	1:13,5	29
Ока	2004	3,8%	42,3%		53,8%	0,0%	2,7:1	1:1,2	26
Сура	2001	49,4%	37,5%		10,2%	2,8%	1,7:1	6,7:1	176
Западная Двина	2003	36,2%			63,8%		3,7:1	1:1,8	69
	2005	32,3%			67,7%		5,6:1	1:2,1	113
Днепр (верхнее течение)	2003	53,2%			46,8%		2,8:1	1,1:1	47
	2005	54,1%			45,9%		4,1:1	1,2:1	44
Дон, Сосна, Лесной Воронеж,	2004		77,8%	5,9%		16,3%	1,4:1	5:1	203
	2005		21,7%	17,4%		60,9%	27:1	1:1,6	63
ИТОГО									1707

В состав уже известного однополо-двуполого комплекса р. Москвы, а также рек Сура и Ока, входят два бисексуальных вида *C. taenia*, *C. melanoleuca*, триплоидная и две тетраплоидные формы, которые нами не дифференцированы в данной работе. Объединение двух тетраплоидных форм в одну в рамках наших исследований не влияет на общие выводы работы. В р. Западной Двине и верхнем течении р. Днепра в составе комплекса обнаружен один бисексуальный вид *C. taenia* и однополая триплоидная форма. В бассейне Дона диплоидно-тетраплоидный комплекс помимо однополой тетраплоидной формы включает два вида щиповок *C. melanoleuca* и *C. rossomeridionalis*. Кроме этих данных таблица включает данные о соотношении полов, а также бисексуальных видов и полиплоидных форм в комплексах. Для р. Москвы приведены данные по соотношению форм за 5 лет наблюдений. Общее количество проанализированных рыб в комплексах составляет 1707 экземпляров.

3.3. Клональная структура однополых форм.

Исследование клональной структуры однополых форм проводили с помощью ДНК-фингерпринтинга.

На рис. 2 представлены варианты мультилокусного ДНК-фингерпринтинга особей триплоидной формы из Москва-реки. У этих триплоидов, также как у триплоидов из Оки, обнаружены идентичные спектры фрагментов ДНК. Фингерпринтные фенотипы (индивидуальные спектры маркеров) содержат в среднем от 23 до 42 фрагментов на особь в диапазоне размеров от 23,1 до 2 т. п. н. Количественные оценки индексов сходства для выборки из 38 особей из р. Москвы для $(GATA)_4$, $(TCC)_5$ и $(CT)_9$ олигонуклеотидных проб равны 1, также как и для выборки из 20 особей из того же комплекса, включая 7 триплоидных особей из клонально-бисексуального комплекса р. Оки, для $(GACA)_4$, $(GATA)_4$

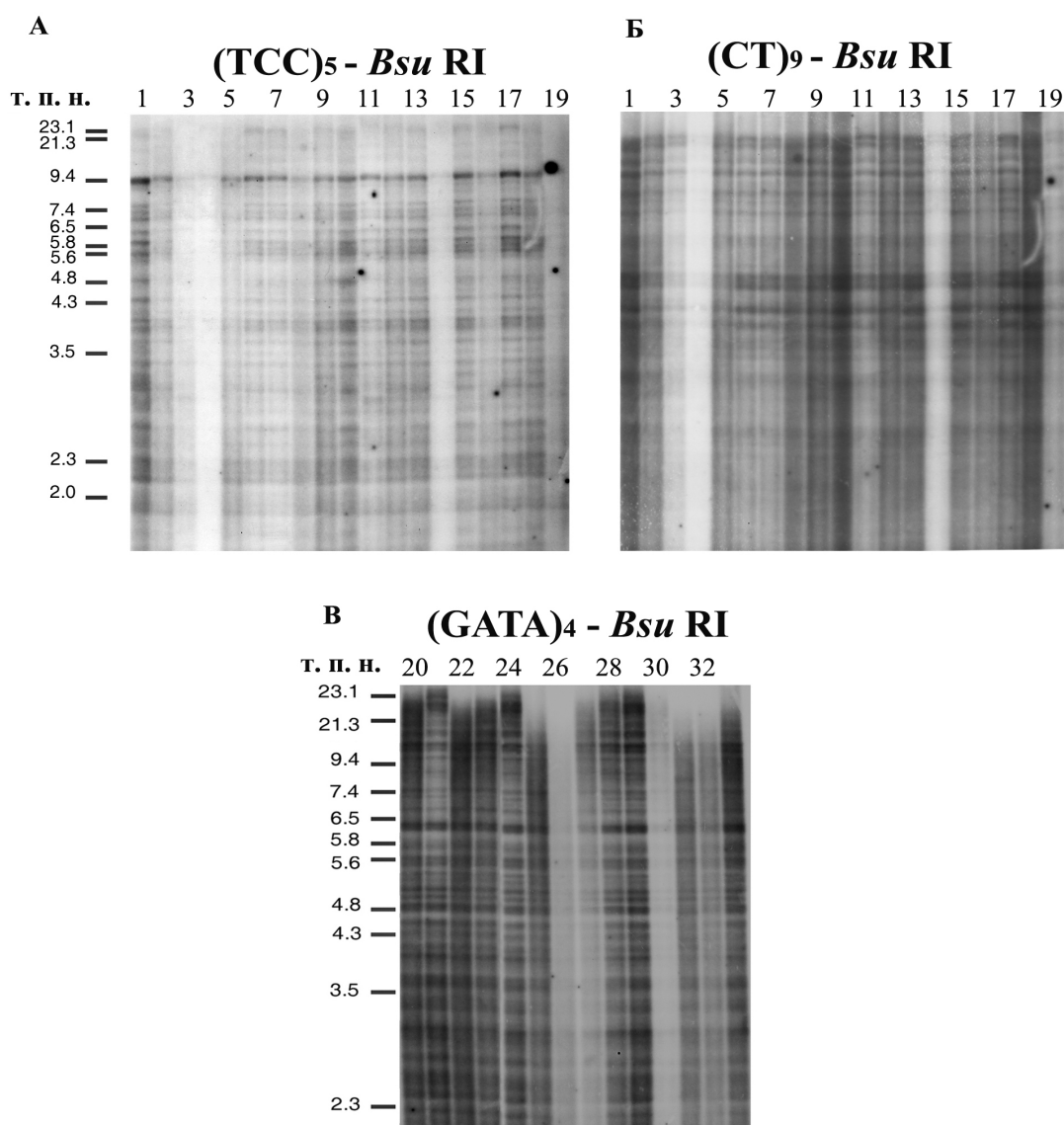


Рисунок 2. ДНК-фингерпринтный анализ триплоидных особей клонально-бисексуального комплекса из рек Москвы (дорожки 1-26) и Оки (дорожки 27-33). Образцы ДНК, обработанные рестриктазой, последовательно гибридизовали с мечеными олигонуклеотидными зондами $(TCC)_5$ (А), $(CT)_9$ (Б) и $(GATA)_4$ (В). В качестве маркерных фрагментов (т. п. н.) использовали ДНК фага λ , обработанную *Hind* III и *Eco* RI.

и (TCT)₆. Таким образом, показана принадлежность триплоидной формы клонально-бисексуальных комплексов рек Москвы и Оки к одной клональной линии.

Иная картина наблюдается при проведении фингерпринтного анализа триплоидных форм из бассейна р. Западной Двины и верхнего течения р. Днепра. На рис. 3 представлены данные ДНК-фингерпринтинга триплоидов клонально-бисексуальных комплексов Западной Двины и Днепра. Даже при визуальном анализе фингерпринтных картин хорошо заметны различия между особями исследованных триплоидных форм.

Все количественные оценки геномной вариабельности микросателлитных локусов проводились для каждого клона и для особей, принадлежащих одному клону, отдельно.

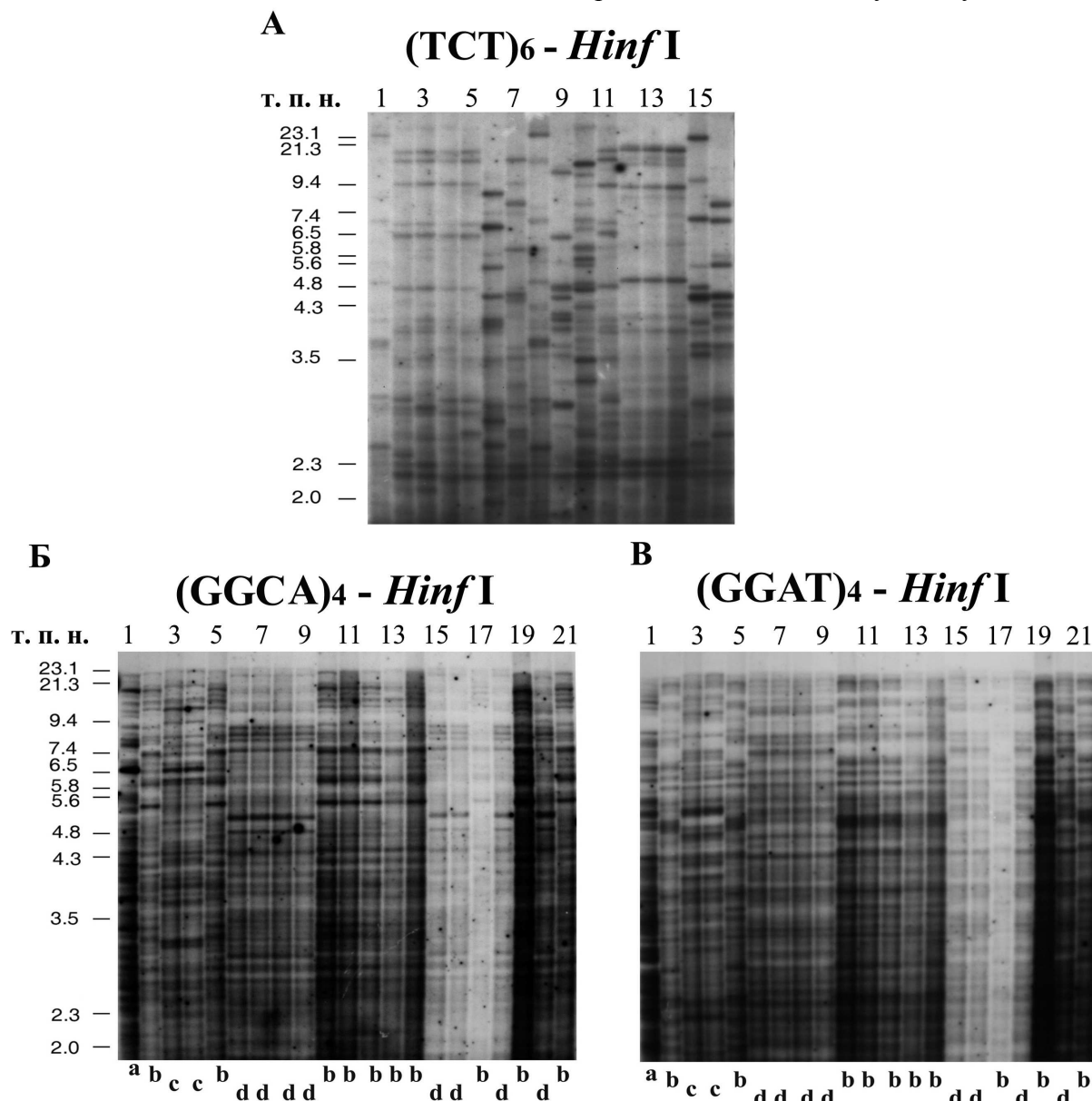


Рисунок 3. Мультилокусный ДНК-фингерпринтинг триплоидных форм щиповок из бассейнов р. Западной Двины и р. Днепра. Образцы ДНК обрабатывали рестриктазой *Hinf* I и гибридизовали с зондами (TCT)₆ (А), (GGCA)₄ (Б), (GGAT)₄ (В). А) – триплоидные особи (дорожки 1-8) и самка *C. taenia* (дорожка 9) из Западной Двины, триплоидные особи (дорожки 10-14) и самки *C. taenia* (дорожки 15,16) из Днепра. Б), В) – триплоидные особи из клонально-бисексуального комплекса Западной Двины, снизу буквами (a-d) отмечены выявляемые клоны. В качестве маркерных фрагментов (т. п. н.) использовали ДНК фага λ, обработанную *Hind* III и *Eco* RI.

Фингерпринтные спектры западновинских и днепровских триплоидных особей содержат в среднем от 24 до 46 полос на особь в диапазоне размеров от 23,1 до 2 т. п. н.

Сравнительный анализ изменчивости микросателлитных маркеров ДНК у 21 особи триплоидной формы из Западной Двины показал, что межклональные индексы сходства варьируют от 0,232 для $(GATA)_4$ при сравнении клонов **b** и **c** (см. рис. 3) до 0,557 для $(TCT)_6$ при сравнении **d** и **c** (см. рис. 3). Количественное соотношение по клонам составило 1: 10: 2: 8. Оценка внутривклональной изменчивости показала, что наибольшая вариабельность наблюдается в наиболее многочисленном клоне **b** (величина *S* меняется от 0,922 для $(TCT)_6$ до 0,976 для $(GGCA)_4$).

Анализ фингерпринтных спектров днепровских триплоидных особей выявил 5 клонов, при этом выявленное количественное соотношение было 7:4:2:2:6. Результаты анализа объединенной матрицы данных для выборки из 21 особи показали, что средние значения индексов сходства (*S*) составляют величины от 0,339 для $(GGAT)_4$ при сравнении клонов 1 и 4 до 0,711 для $(GGAT)_4$ при сравнении 1 и 2 клонов. Наиболее вариабельным среди днепровских триплоидных клонов был клон 2 со средним внутривклональным индексом сходства 0,781, выявленном при анализе матрицы для $(GATA)_4$, наименее вариабельным – клон 1 (*S* = 0,981 для $(GGAT)_4$).

ДНК-фингерпринтные профили тетраплоидных особей из р. Москвы показали весьма гетерогенную картину (рис. 4). При использовании $(GACA)_4$ – ДНК-проб у тетраплоидных

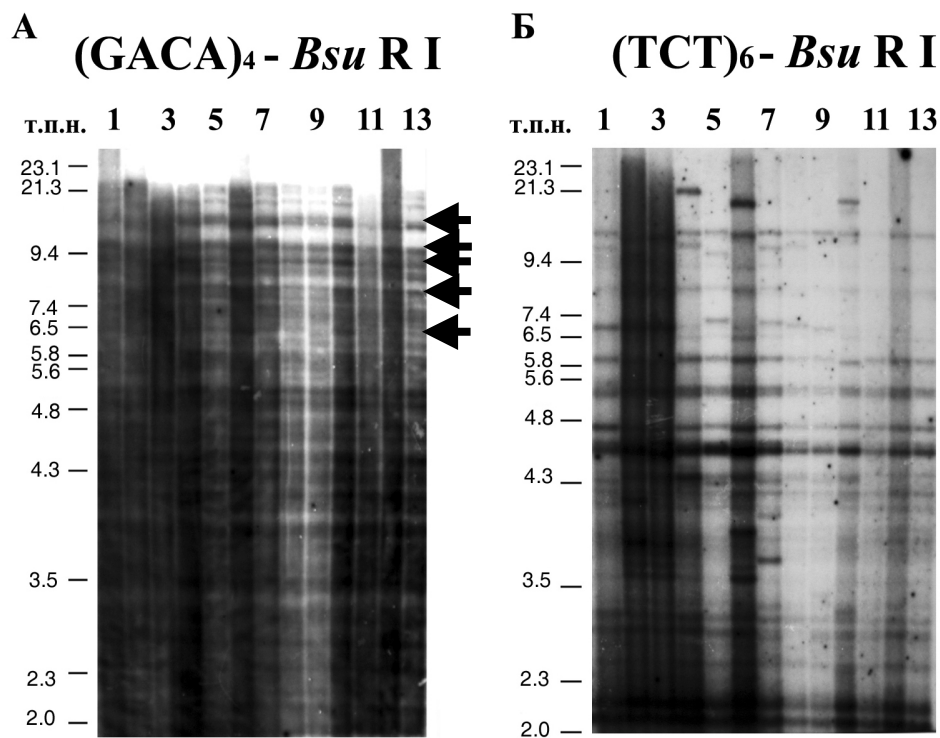


Рисунок 4. Мультилокусный ДНК-фингерпринтинг тетраплоидных форм щиповок (дорожки 1-10) и триплоидных (дорожки 11-13) из бассейна р. Москвы. Образцы ДНК обрабатывали рестриктазой *Bsu R I* и гибридизовали с зондами $(GACA)_4$ (А), $(TCT)_6$ (Б). Стрелками указаны участки спектров со слабоподвижными фрагментами ДНК.

особей из р. Москва, где существуют рядом две тетраплоидные формы, одна из которых представлена самками и самцами, а вторая только самками, обнаружены слабые различия в подвижности фрагментов ДНК (рис. 4 А, показаны стрелками). ДНК-фингерпринтинг тех же особей с (TCT)₆ – ДНК-пробой показал, что на фоне высокого внутривидового сходства фингерпринтных «фенотипов» как тетраплоидных, так и триплоидных особей из того же водного бассейна, наблюдается вариабельность некоторых микросателлитных фрагментов ДНК (рис. 4 Б). Показано, что самцы и самки тетраплоидной формы обладают высокой гетерогенностью. Средние индексы сходства, полученные при анализе объединенной матрицы для выборки из 10 особей (3 самки и 7 самцов), составили для зонда (TCT)₆ 0,805 (0,054) для самцов и 0,780 (0,102) для самок при среднем числе полос 16,5 и 15, соответственно.

На рис. 5 представлены ДНК-фингерпринтные профили однополой тетраплоидной формы из бассейна р. Дона. Индивидуальные спектры маркеров содержат в среднем от 25 до 46 фрагментов на особь в диапазоне размеров от 23,1 до 2 т. п. н. Количественные оценки индексов сходства для выборки из 18 особей из Дона и Сосны для (GATA)₄, (GACA)₄, (TCT)₆, (GGAT)₄ и (GGCA)₄ - олигонуклеотидных проб варьируют от 0,913 до 1, что свидетельствует о наличии здесь одного по происхождению клона.

Средний индекс сходства, рассчитанный по матрице данных ДНК-фингерпринтинга для диплоидного двуполого вида *C. rossomeridionalis* из бассейна Дона составил 0,449 (при среднем количестве полос на особь 24,5).

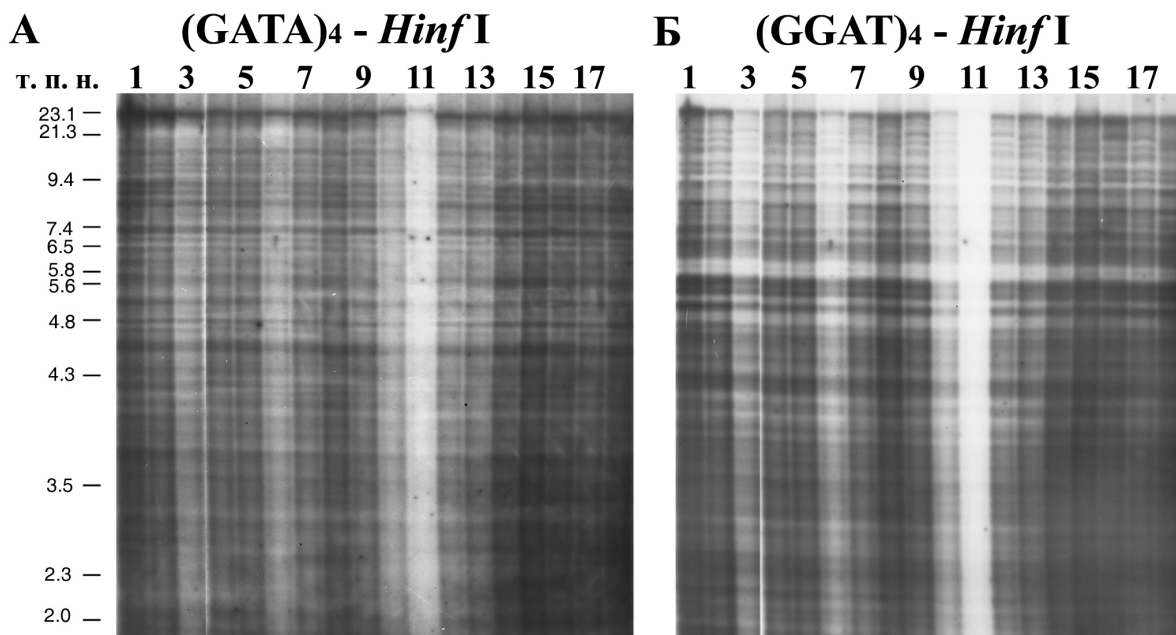


Рисунок 5. ДНК-фингерпринтный анализ тетраплоидных особей клоально-бисексуального комплекса из бассейнов рек Дон (дорожки 1-3) и Сосна (дорожки 4-18). Образцы ДНК, обработанные рестриктазой *Hinf* I, гибридизовали с мечеными олигонуклеотидными зондами (GATA)₄ (А), (GGAT)₄ (Б). В качестве маркерных фрагментов (т. п. н.) использовали ДНК фага λ, обработанную *Hind* III и *Eco* RI.

Глава IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Распространение однополо-двуполых комплексов: в целом и в пределах одного бассейна. Относительная численность форм. Определение ареала клонально-бисексуальных комплексов имеет важное значение по двум причинам: 1) в связи с интерпретацией происхождения моно- и поликлональности однополых форм в различных районах их распространения; 2) для объяснения особенностей сосуществования клональных и бисексуальных форм в пределах одного водного бассейна. Поэтому одной из задач диссертации было изучение распространения однополо-двуполых комплексов р. *Cobitis* в водоемах России, как в целом, так и в пределах отдельных водных бассейнов. Наши исследования охватывали бассейны практически всех крупных рек европейской части России: Волги, Дона, Кубани, верхнего и среднего течения Днепра, а также бассейн р. Западной Двины. Результаты этих исследований представлены на рис. 1. Восточной границей распространения комплексов является бассейн р. Волги, т. к. в реках Малый и Большой Узень, которые принадлежат независимому водному бассейну восточнее бассейна р. Волги, обитают только бисексуальные виды *C. taenia* и *C. melanoleuca*. Бассейн этих рек, согласно нашим данным, является восточной границей ареала *C. taenia*. Однополо-двуполые комплексы так же отсутствуют в бассейне р. Кубани и более южных реках бассейна Азовского и Черного морей. В бассейне р. Кубани, также как и в бассейне р. Дона *C. taenia* отсутствует, но здесь обитают *C. rossomeridionalis* и *C. melanoleuca*. Однополо-двуполые комплексы обнаружены нами и в р. Западной Двине. В реках с северным и северо-западным стоком восточнее р. Западной Двины соответствующие исследования не проводились, поэтому восточная граница ареала для северных рек остается неизвестной. Таким образом, согласно литературным (Васильев, Васильева, 1982, Васильев, 1990, Васильева, Васильев, 1998, Bohlen et al., 2002, Ворон, 2003) и полученным нами данным ареал однополо-двуполых комплексов щиповок охватывает бассейны р. Дуная и р. Рейна на западе и далее на восток до бассейна р. Волги, а для рек бассейна Балтийского моря, по меньшей мере, до Западной Двины. Следует заметить, что ареал однополо-двуполых комплексов тесно связан с ареалами четырех диплоидных бисексуальных видов: *C. taenia*, *C. rossomeridionalis*, *C. tanaitica* и *C. elongatoides*, он больше ареалов трех последних видов, но несколько меньше, чем ареал *C. taenia*. Это связано с тем, что однополые формы имеют гибридное происхождение и их геномы в разных сочетаниях включают геномы вышеперечисленных видов. Филогеографические исследования (цитохром b) показали, что экспансия *C. taenia* осуществлялась от бассейна Каспия в Европу в западном и северо-западном направлениях (Culling et al, 2006). Согласно данным по распространению комплексов и происхождению изученных нами однополых форм (Lebedeva et al., 2006, Васильев и др., 2007 а, б), можно полагать, что расселение многих однополых форм шло наоборот с запада на восток,

поскольку геномы восточных однополых форм включают геномы более западных и южных диплоидных бисексуальных видов (*C. rossomeridionalis*, *C. tanaitica* и *C. elongatoides*) (табл.4).

В разных частях своего ареала однополые формы для своего размножения используют самцов близкородственных бисексуальных видов: в бассейне р. Дона в размножении однополой формы участвуют самцы южнорусской (*C. rossomeridionalis*) и сибирской (*C. melanoleuca*) щиповок, в бассейне Волги – самцы обыкновенной и сибирской щиповок, в верхнем и среднем течении Днепра и Западной Двине – самцы обыкновенной щиповки.

Клональные формы в отличие от генетически рекомбинантных бисексуальных форм имеют фиксированные генотипы. Уже это дает основание полагать, что первые по сравнению со вторыми более стенобионтны. Ситуация существенно вряд ли изменится, если клональная форма представлена не одним, а множеством клонов. Во-первых, генетическое разнообразие клонов всегда будет существенно ниже генетического разнообразия бисексуальных форм. Во-вторых, если значительная доля клонального разнообразия связана не с множественным происхождением клонов, а с мутациями, то различия между клонами будут минимальными и существенно ниже индивидуальных генетических различий бисексуальных форм. Во всяком случае, клональное разнообразие вряд ли может обеспечить такую же степень эврибионтности, как

Таблица 4. Кариотипическая реконструкция геномов изученных однополых форм и состав комплексов

Водный бассейн	Уровень плоидности	Число хромосом	m	sm	sta	Гипотетические родительские виды	Бисексуальные виды, входящие в комплекс
Западная Двина	3n	74	13	39	22	<i>C. taenia</i> - 2 <i>C. rossomeridionalis</i>	<i>C. taenia</i>
Верхний Днепр	3n	74	23	32	19	<i>C. taenia</i> - <i>C. rossomeridionalis</i> - <i>C. elongatoides</i>	<i>C. taenia</i>
Москва, Ока	3n	74	23	27	24	<i>C. taenia</i> - <i>C. rossomeridionalis</i> - <i>Cobitis sp.1(?)</i> или <i>C. taenia</i> - <i>C. elongatoides</i> - <i>Cobitis sp.2 (??)</i>	<i>C. taenia</i> <i>C. melanoleuca</i>
Дон	4n	98	29	40	29	2 <i>C. taenia</i> - <i>C. rossomeridionalis</i> - <i>C. elongatoides</i>	<i>C. rossomeridionalis</i> <i>C. melanoleuca</i>

Примечание: **m** – мета-, **sm** – число субмета- и **sta** – число субтело- и акроцентрических хромосом; обозначение *C. taenia*-2 *C. rossomeridionalis* означает, что геном этой формы (Западная Двина) состоит из гаплоидного генома *C. taenia* и диплоидного генома *C. rossomeridionalis*, аналогичное обозначение дано для других форм. Таблица составлена по данным следующих авторов: Lebedeva et al., 2006, Васильев и др., 2007 а,б.

индивидуальное генетическое разнообразие рекомбинантных форм. Анализ распределения однополых и двуполых форм щиповок в бассейнах р. Дона и р. Волги показывает, что это действительно так. Согласно нашим данным, бисексуальные виды щиповок в пределах отдельных бассейнов встречаются практически повсеместно, в то время как однополые формы имеют более ограниченный ареал. Так, однополые формы не встречаются в средних и верхних течениях небольших речек и ручьев, иногда они отсутствуют и в относительно крупных реках (Калитва и Маныч, бассейн р. Дона), а так же в некоторых участках крупных рек (дельта р. Дона). Во всех этих местах бисексуальные виды (южнорусская и сибирская щиповки) достаточно обильны. Аналогичная ситуация характерна и для других водных бассейнов. Таким образом, эти данные показывают, что однополые формы щиповок действительно более узко адаптированы, чем двуполые. Ранее сходный анализ был сделан для клональных и полуклональных форм р. *Poecilia* и р. *Poeciliopsis* (Moore et al., 1970, Moore, 1975, Vrijenhoek, 1978). Так, исследование встречаемости и относительной численности двуполых и однополых форм р. *Poeciliopsis* в бассейнах пяти рек показало, что в четырех из них однополая форма обитает не во всех локальностях, где обнаружены двуполые формы (Moore et al., 1970). Для однополо-двуполых комплексов р. *Poeciliopsis* выявлена тенденция, согласно которой доля однополых форм возрастает от верхнего течения ручьев к нижнему течению (Vrijenhoek, 1978). Более того, распределение однополых форм этого рода находится в зависимости от дозы генома *monacha-lucida*: в ряду *P. monacha* (двуполоая форма), *P. 2 monacha-lucida* (однополая форма), *P. monacha-2 lucida* (однополая форма), *P. lucida* (двуполоая форма) прослеживается постепенное уменьшение доли форм *monacha* от верхнего течения к нижнему и увеличение доли форм *lucida* в этом же направлении (Moore, 1984). Хотя мы не проводили столь детальный анализ распределения однополых форм щиповок от верхнего к нижнему течению небольших речек и ручьев, наши наблюдения свидетельствуют о сходной тенденции: однополые формы присутствуют только в устьях указанных водоемов.

Прежде чем перейти к обсуждению структуры комплексов кратко остановимся на происхождении однополых форм в исследованных нами комплексах. Сразу необходимо отметить, что все эти однополые формы имеют различное происхождение (табл. 4). Так, геном однополой формы из р. Западной Двины включает один геном *C. taenia* и два генома *C. rossomeridionalis*, эта форма имеет дигибридное происхождение. Однополая форма из верхнего течения р. Днепра имеет тригибридное происхождение. Однако наиболее сложную тригибридную структуру генома имеет однополая тетраплоидная форма из бассейна р. Дона – два генома *C. taenia* один геном *C. rossomeridionalis* и один геном *C. elongatoides*.

Как видно из табл. 3 и 4, все однополые формы отличаются не только по своему происхождению, но также и по относительной численности в комплексе. При рассмотрении

относительной численности входящих в комплекс форм возможны две качественно различные ситуации, которые в значительной степени могут влиять на экологические отношения и характер сосуществования клональных (однополых) и двуполых форм. 1. Однополые формы сосуществуют с одним или двумя видами, при гибридизации которых они произошли, и самцов которых используют для своего размножения. Это - все известные однополо-двуполые комплексы (р. *Poecilia*, *Poeciliopsis*, *Menidia*, *Phoxinus*, *Fundulus*) (назовем такие комплексы - тип А), кроме многих комплексов в р. *Cobitis*. 2. Однополые формы сосуществуют с видом, геном которого не входит в геном этих форм, при этом в комплекс могут входить и виды, которые в результате гибридизации дали начало однополой форме (тип В). Именно такие комплексы встречаются в бассейне р. Волги и р. Дона, где однополые формы для своего размножения используют главным образом самцов сибирской щиповки *C. melanoleuca*.

Естественно полагать, что если диплоидный бисексуальный вид принимал участие в образовании однополой формы, то между ними, скорее всего, будут минимальные экологические различия. В случае если в комплексе присутствует вид, который не принимал участия в образовании формы, то эти различия должны быть более существенными. К сожалению, несмотря на то, что изучение клонально-бисексуальных комплексов щиповок, особенно после 1992-1995 гг., когда появились первые публикации об их обнаружении в водоемах центральной и западной Европы, приобрело широкий размах, экологические исследования комплексов практически отсутствуют. Лишь в некоторых работах отмечается, что клональные и бисексуальные формы занимают одни и те же биотопы (Bohlen et al., 2002). Согласно нашим наблюдениям какие-либо расхождения в биотопах однополых триплоидных форм и *C. taenia* в комплексах из рек Западная Двина, Днепр и Москва отсутствуют. Сходная ситуация характерна для однополой тетраплоидной формы и *C. rossomeridionalis* из р. Дона. Напротив, однополые формы и *C. melanoleuca*, хотя и встречаются в период нереста в одних и тех же биотопах, в другие периоды по биотопам существенно расходятся. Поскольку однополые формы возникают позже диплоидных бисексуальных видов и стабильно сосуществуют с ними в сходных биотопах, то естественно полагать, что их приспособленность должна быть выше, чем приспособленность диплоидных бисексуальных видов. В противном случае существование однополых форм было бы невозможным. В связи с этим можно ожидать, что относительная численность однополых и двуполых форм в комплексах типа А и В будет различной: в комплексах типа А относительная численность диплоидного бисексуального вида, принимавшего участие в образовании однополой формы, будет выше, чем в комплексах типа В. Действительно, согласно полученным нами данным относительная численность *C. taenia* в комплексах верхнего течения р. Днепра и р. Западной Двины (тип А) составляет 53,2% и 36,2%, тогда как в комплексах р. Москвы и р. Оки (тип В)

она значительно ниже – 1,6 % и 3,8 %, соответственно (табл. 3). Аналогичная ситуация характерна и для комплекса из бассейна р. Дона (тип В), где относительная численность *C. rossomeridionalis* составляет 5,9 %.

Изменение относительной численности форм во времени. Данных об относительной численности однополых и двуполых форм во времени крайне мало, а по комплексам р. *Cobitis* такие данные в литературе отсутствуют. Это связано с тем, что при исследовании комплексов выборки обычно невелики и исследования в разное время одного и того же комплекса проводятся крайне редко. Нам известна только одна работа, где показано, что относительные численности однополой гибридогенетической формы *Poeciliopsis monacha-occidentalis* и самок двуполой *P. occidentalis* непостоянны во времени: в течение 29 лет доля однополой формы в одной из локальностей изменялась в пределах 65% - 97%, в другой – за 4 года доля однополой формы изменилась от 10 % до 21 % (Moore et al., 1970). Благодаря длительным наблюдениям комплекса из р. Москвы мы можем оценить изменения относительной численности форм во времени. В 1982 году, когда был открыт комплекс в р. Москве, было обнаружено следующее соотношение форм: в основном русле реки *C. melanoleuca*- 25,3 %, *C. taenia* – 14,8 %, триплоидная форма – 25,3 %, тетраплоидные формы – 34,6 %, в р. Дубешне (приток р. Москвы) особи *C. melanoleuca* не были обнаружены, а *C. taenia*, триплоидные и тетраплоидные формы находились в соотношении: 24 %, 52 % и 24 %, соответственно (Vasil'ev et al., 1989). К 2001 году соотношение форм коренным образом изменилось (табл. 3). Резко стала доминировать триплоидная форма, и сильно сократилась относительная численность *C. taenia*, также сократилась доля тетраплоидов. Изменения относительных численностей форм в однополо-двуполых комплексах может быть следствием двух основных причин. Первая из них связана с изменениями условий обитания, и в этом случае колебания относительной численности будут носить достаточно случайный характер. Вторая связана с внутренними причинами, а именно с тем, что клонально-бисексуальные комплексы представляют собой достаточно обособленные генетические системы с обратной связью. Эта связь выражается в следующем: при лучшей относительной приспособленности однополой формы и сходных экологических нишах однополых и двуполых форм будет происходить неминуемое вытеснение двуполой формы однополой. Есть несколько очевидных фактов, которые могут обеспечить преимущество однополой формы: 1) так называемое «двойное преимущество», которое выражается в большей популяционной плодовитости однополых форм по сравнению с двуполыми (Смит, 1981); 2) фиксированная и повышенная гетерозиготность, и как следствие, гетерозис (Moore, 1984); 3) личинки триплоидной формы благодаря большим размерам икры триплоидов, более крупные, чем личинки диплоидных бисексуальных форм (Павлов и др., 2004), что уменьшает пресс хищников по сравнению с диплоидными формами. При сильном

уменьшении численности двуполой формы уменьшится число самцов, что повлечет за собой уменьшение численности триплоидной, поскольку для размножения не будет хватать самцов. Нами проведено математическое моделирование этой ситуации (Bobuyev et al., 2003), которое показало, что существуют автоматические колебания относительной численности во времени диплоидной и триплоидной форм, причем эти колебания находятся в противофазе, сама же система достаточно устойчива и может существовать неопределенно долгое время.

Генетическая структура однополых форм. Прежде чем перейти к рассмотрению генетической структуры однополых форм, отметим основные причины их возможного генетического разнообразия. Первая и достаточно очевидная причина генетического разнообразия может быть обусловлена множественным происхождением однополых форм, т. е. происхождением более чем от одной самки. В этом случае генетические различия между отдельными клонами должны быть сопоставимы с индивидуальными генетическими различиями бисексуальных форм. Вторая причина генетического разнообразия может быть связана с мутациями. В этом случае генетические различия между отдельными формами будут минимальными, во всяком случае, значительно меньшими, чем индивидуальные генетические различия у бисексуальных форм. Третья причина может быть обусловлена конъюгацией в мейозе не сестринских хромосом, а гомологичных хромосом, что может приводить к генетическим рекомбинациям. И последняя причина генетической variability однополой формы может быть связана с тем, что такие формы или не все особи таких форм размножаются клонально.

В настоящей диссертации впервые получены данные по генетической структуре четырех однополых форм рода *Cobitis* и одной тетраплоидной формы из р. Москвы, которая представлена как самками, так и самцами. Согласно полученным данным однополая триплоидная форма из р. Москвы и р. Оки представлена одним клоном (рис. 2). Аналогичная картина выявлена и для тетраплоидной формы из бассейна р. Дона: все изученные особи из двух локальностей являются сходными по ДНК-фingerprintным спектрам (рис. 5). Эти данные свидетельствуют не только о моноклональности однополых форм, но также и о том, что эти формы имеют клональное наследование и размножаются без участия генетического материала самцов. Если для триплоидов из р. Москвы ранее с помощью экспериментальных скрещиваний и алозимного анализа было показано, что эта форма является клональной (Vasil'ev et al., 1989), и наши данные подтверждают этот вывод, то для однополой тетраплоидной формы из р. Дона клональное наследование доказано впервые. Здесь следует отметить, что со времени обнаружения однополых форм позвоночных и до недавнего времени автоматически считалось, что эти формы являются клональными. Однако после того как было обнаружено сетчатое размножение у рыб, в том числе представителей рода *Cobitis* (Kim, Lee, 1995, 2000) и *Rutilus* (Alves et al., 1998) и показано, что иногда триплоидные

формы могут продуцировать диплоидные гаметы, в частности у рыб и жаб из комплекса *Bufo viridis* (Stock et al., 2002), стало очевидным, что доказательство клональности однополых форм в каждом случае требует специальных исследований.

Обнаруженная нами моноклональность триплоидной формы из р. Москвы и р. Оки и тетраплоидной формы из бассейна р. Дона обусловлена по нашему мнению локальным происхождением, т. е. проникновением в данные водоемы одно гибридной самки или нескольких самок, принадлежащих одному клону. Действительно, в бассейне р. Волги присутствует только один вид (*C. taenia*), который принимал участие в происхождении триплоидной формы (табл.4), в связи с этим маловероятно, что триплоидная форма возникла в данном речном бассейне. Аналогичная ситуация характерна и для однополых тетраплоидной формы из бассейна р. Дона, где из родительских видов (табл. 4) встречается только *C. rossomeridionalis*, тогда как *C. taenia* и *C. elongatoides* отсутствуют. Другая вероятная причина моноклональности связана с тем, что из первоначального множества проникших клонов остался один наиболее конкурентно способный. Моноклональность у однополых форм рыб встречается крайне редко, обычно геногенетические и гибридогенетические формы родов *Poecilia*, *Poeciliopsis* представлены более чем одним клоном. Иногда количество клонов может быть достаточно большим (Angus, Schultz, 1979, Moore, Eisenbrey, 1979, Turner et al., 1983, Moore, 1984 и др.). Например, при изучении геногенетической формы *Poecilia formosa* (*P. mexicana-latipinna*) с использованием проб (CAC)₅ и (GACA)₄ в ДНК-фингерпринтинге была обнаружена высокая гетерогенность образцов, полученных из различных лабораторий и природных источников (Turner et al., 1990). Насколько нам известно, описан лишь один случай строгой моноклональности у однополых рыб (р. *Phoxinus*). Исследование достаточно большой выборки этой формы при использовании ДНК-фингерпринтных проб (CAC)₅, (GACA)₄ и Jeffrey's core 33.15 не выявило какой-либо гетерогенности (Elder, Schlosser, 1995). Интересно отметить, что выборки однополой формы были собраны в различных биотопах речного и озерного типа. Тем не менее, в нашем случае мы можем полагать, что ограниченное распространение однополых форм (по сравнению с двуполыми) в бассейне р. Дона и р. Волги в значительной степени связано с их моноклональностью.

Кроме тетраплоидов из бассейна р. Дона нами исследованы тетраплоидные формы из р. Москвы, где выявлена совершенно иная картина. Как видно на рис. 4, при использовании рестриктазы *Hinf* I и зонда (TCT)₆, (GACA)₄ для всех изученных самцов получены переменные фингерпринтные спектры. Сравнение фингерпринтных спектров триплоидной геногенетической формы (дорожки 11-13, рис. 4 Б) и тетраплоидов из р. Москвы показывает, что практически все идентифицированные у триплоидных особей полосы обнаруживаются у тетраплоидных самцов и самок. Это свидетельствует о присутствии в геноме тетраплоидных

форм генома триплоидной формы, то есть подтверждает их происхождение от триплоидов, показанное в более ранних работах с помощью алозимного и цитогенетического анализа (Васильев и др., 1983). В целом анализ фингерпринтных спектров показывает, что тетраплоидные самки могут образовываться как клоны, так и возникать *de novo*. Незначительная величина выборки не позволяет обосновать какое-либо из этих предположений. Можно только отметить, что эксперименты по скрещиванию этой тетраплоидной формы с выюном показали, что, по меньшей мере, часть этих самок может размножаться с помощью гиногенеза. Что касается самцов, то все они отличаются друг от друга по фингерпринтным спектрам, что, скорее всего, свидетельствует об их происхождении *de novo*.

Полиплоидные самцы в клонально-бисексуальных комплексах рыб встречаются крайне редко. Например, за большой период исследований в гиногенетических популяциях *Poecilia formosa* обнаружено лишь несколько десятков самцов (Darnell, Abramoff, 1968), у серебряного карася их частота еще ниже – за 25-ти летний период исследований было найдено только 2 самца (Черфас, 1987). Поскольку у серебряного карася триплоидные особи не могут возникать *de novo*, а частота встречаемости самцов очень маленькая, то предполагается, что возникновение этих самцов связано с гормональными нарушениями, то есть с инверсией пола у генотипических самок. Если бы возникновение тетраплоидных самцов у щиповок было результатом гормонального переопределения пола, как это предполагается для триплоидных самцов серебряного карася, то следовало бы ожидать сходства ДНК-фингерпринтных профилей, если не всех самцов, то хотя бы части из них, а также сходства с самками или частью самок, чего однако не наблюдается.

Несмотря на то, что часть тетраплоидных самок из комплекса р. Москвы может размножаться клонально, нет оснований считать, что здесь существуют стабильные клональные тетраплоидные формы, что предполагалось ранее (Васильев и др., 1990б). Вполне возможна ситуация “динамического равновесия”. Поскольку тетраплоидные особи могут возникать *de novo*, то может оказаться, что часть из возникших самок может размножаться клонально, а часть из них может иметь пониженную плодовитость или оказаться стерильными (Vasil'ev et al., 2003). Возникшие клоны от отдельных самок могут существовать недолгое время, но с небольшой и постоянной частотой могут возникать вновь.

Поликлональность, обнаруженная при изучении генетической структуры однополых триплоидных форм из комплексов Верхнего Днепра и Западной Двины, может быть результатом ряда причин. Необходимо сразу отметить, что наличие нескольких представителей одного клона в наших выборках свидетельствует о наличии клонального наследования у однополых триплоидных форм, т. е. гиногенетического размножения. Однако, как хорошо известно, у форм с естественным гиногенезом иногда может

происходить истинное оплодотворение, в результате чего в комплексе могут появляться формы с большей, чем однополые формы плоидностью. В наших выборках из Днепра и Западной Двины были только триплоидные формы. В связи с этим генетическая гетерогенность однополых форм из этих водоемов не может быть связана с нарушением механизмов гиногенеза. Вторая причина гетерогенности этих однополых триплоидных форм может быть связана с тем, что часть особей размножается с помощью гибридогенеза, т. е. при созревании триплоидов избирательно элиминируется гаплоидный набор какого-либо из родительских видов, скорее всего, *C. taenia*, и затем диплоидная яйцеклетка вновь оплодотворяется. Однако этот процесс по нашему мнению является практически невероятным. Если бы у триплоидов действительно элиминировался один геном, то далее, во всяком случае, у однополой формы из р. Западной Двины, происходил бы нормальный мейоз и продукция гаплоидных гамет, как это наблюдается у *C. 2 sinensis - longicarpus* и *C. sinensis - 2 longicarpus* (Kim, Lee, 1995, 2000). Что касается однополой формы из верхнего Днепра, то после элиминации генома *C. taenia* останется диплоидный гибридный геном (*C. rossomeridionalis* + *C. elongatoides*). В этом случае может не происходить редукции числа хромосом, яйцеклетка окажется диплоидной, и после оплодотворения возникнут новые триплоидные особи. Несмотря на эти возможности, представляется наиболее вероятным, что поликлональность у однополых триплоидных форм из Западной Двины и верхнего Днепра обусловлена множественным происхождением, т. е. однополые формы ведут свое начало от нескольких гибридных самок. Это тем более вероятно, что уровень различий между клонами сопоставим с индивидуальными различиями особей бисексуальных видов. Например, как уже отмечалось выше, средний индекс сходства между клонами составляет 0,422 для р. Западной Двины и 0,487 для верхнего течения р. Днепра, тогда как индекс сходства для диплоидного бисексуального вида *C. rossomeridionalis* составил 0,449.

Подсчеты индексов сходства внутри отдельных клонов также показывают некоторую вариабельность, значительно меньшую, чем между клонами. Эта вариабельность может быть связана с рядом причин. 1. Накопление мутаций внутри единых по происхождению клонов. В этом случае следует ожидать, что ДНК-профили особей одного клона будут иметь незначительные отличия. 2. Незначительные различия между фингерпринтными спектрами отдельных особей одного клона могут быть связаны с визуальной погрешностью оценки слабовыраженных полос. Таким образом, не исключено, что структура однополых форм может быть более сложной и включать не только разнообразие по происхождению, но также разнообразие по мутациям.

ВЫВОДЫ

1. Однополо-двуполые комплексы щиповок р. *Cobitis* распространены в бассейнах крупных рек Европейской части России. Восточной границей их ареала является бассейн Волги, в южных реках (р. Кубань и более южные реки) однополо-двуполые комплексы не обнаружены. В бассейне Балтийского моря однополо-двуполый комплекс найден в р. Западной Двине. В пределах одного водного бассейна однополые клональные формы щиповок распространены гораздо менее широко, чем диплоидные бисексуальные виды (*C. taenia*, *C. rossomeridionalis* и *C. melanoleuca*).
2. Обнаружены ранее неизвестные однополо-двуполые диплоидно-триплоидные комплексы в р. Западная Двина и в верхнем течении Днепра, диплоидно-триплоидно-тетраплоидный комплекс в р. Сура, а также уникальный среди позвоночных диплоидно-тетраплоидный комплекс в бассейне Дона, где тетраплоидная форма представлена исключительно самками.
3. Однополая тетраплоидная форма из бассейна Дона и однополые триплоидные формы из р. Западной Двины и верхнего течения Днепра характеризуются клональным наследованием и таким образом размножаются без использования генетического материала самцов.
4. Относительная численность форм в клонально-бисексуальных комплексах зависит от их структуры: если однополая форма для своего размножения может использовать самцов неродительского вида, то относительная численность двуполого родительского вида в комплексе низкая, если такой возможности нет, то его относительная численность достаточно высокая.
5. Однополая триплоидная форма из рек Москва и Ока, а также тетраплоидная однополая форма из бассейна Дона являются моноклональными. Моноклональность этих форм обусловлена их локальным географическим происхождением.
6. Триплоидные однополые формы из р. Западная Двина и верхнего течения Днепра являются поликлональными, что связано с их множественным происхождением.
7. По меньшей мере, часть тетраплоидных особей, включая всех самцов, из однополо-двуполого комплекса р. Москва возникают *de novo* в каждом поколении.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. A. Bobyrev, V. Burmensky, V. Vasil`ev, E. Kriksunov, **E. Lebedeva**. Coexistence of triploid and diploid forms of spiny loach, *Cobitis taenia*: a model-based approach // Folia biologica. – 2003. - Vol. 51(Suppl.). - P. 55-60.

2. **Е.Б. Лебедева**, В.П. Васильев, А.П. Рысков. Моноклональность гиногенетической формы рыб рода *Cobitis* (Cobitidae) в одном из районов ее ареала (по данным ДНК-фингерпринтинга) // ДАН.- 2005. Том 401. №1. – С.136-138.
3. В.П. Васильев, **Е.Б. Лебедева**, Е.Д. Васильева, Е.С. Левенкова, А.П. Рысков. Уникальный диплоидно-тетраплоидный однополо-двуполый комплекс рыб (Pisces, Cobitidae) // ДАН. – 2005. Том 404. №4. - С. 559-561.
4. В.П. Васильев, **Е.Б. Лебедева**, Е.Д. Васильева, А.П. Рысков. Моноклональные и возникающие de novo тетраплоидные формы рыб рода *Cobitis* (Cobitidae) из различных клонально-бисексуальных комплексов // ДАН. – 2007. Том 416. №4 – С. 559-562.

Тезисы:

5. A. Bobyrev, V. Burmensky, V. Vasil`ev, E. Kriksunov, **Е. Lebedeva**. Coexistence of triploid and diploid forms of spiny loach, *Cobitis taenia*: a modeling approach // Theses of the 2nd International conference “Loaches of the Genus *Cobitis* and Related Genera”. - Olsztyn, Poland, 2002. - P.20.
6. В.П. Васильев, **Е.Б. Лебедева**, Е.Д. Васильева, Е.С. Левенкова, М.Н. Мельникова. Пространственная и временная генетическая структура представителей бисексуальных и клональных видов позвоночных. // Тезисы докладов отчетной конференции по программе фундаментальных исследований «Динамика генофондов растений, животных и человека» - Москва, 2005. - С.21-22.
7. А.П. Рысков, О.Н. Токарская, Н.С. Куприянова, С.К. Семенова, И.А. Мартиросян, Д.Н. Малышева, В.И. Корчагин, Т.Н. Бадаева, К.К. Нечволодов, А.С. Воронов, Г.Г. Хрисанфова, В.А. Васильев, А.В. Корсуненко, И.С. Даревский, В.П. Васильев, **Е.Б. Лебедева**, Е.В. Морозова, С.О. Мовсесян. Изучение генетической изменчивости популяций однополых и двуполых видов животных на основе технологий геномного фингерпринтинга и геномной инженерии. // Тезисы докладов отчетной конференции по программе фундаментальных исследований «Динамика генофондов растений, животных и человека» - Москва, 2005. - С.28-30.
8. **Е.Б. Лебедева**. Моноклональность гиногенетической формы рыб рода *Cobitis* (Cobitidae) в одном из районов ее ареала (по данным ДНК-фингерпринтинга). // Сборник тезисов докладов 9-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология- наука XXI века» - Пушино, 2005. - С.36-37.
9. В.П. Васильев, Е.Д. Васильева, Е.С. Левенкова, **Е.Б. Лебедева**. Происхождение клональных форм щиповок (р. *Cobitis*) Западной Двины, верхнего Днепра и бассейна Дона. // Тезисы докладов отчетной конференции по программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов». - Москва, 2006. - С. 22-23.

10. **E. Lebedeva**, V. Vasil'ev, E. Vasil'eva, A. Ryskov. The clonal structure of all-female triploid and tetraploid forms from genus *Cobitis* occurred in water bodies of Russia: DNA-fingerprinting data // Programme & books of abstracts of the 3rd International Conference “Loaches of the genus *Cobitis* and related genera/ Biology, systematics, genetics, distribution, ecology & conservation”. - Šibenik, Croatia, 2006. – P. 31-32.