

# ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ИНВАЗИОННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РОТАНА *PERCCOTTUS GLENII* (PERCIFORMES: ODONTOBUTIDAE) БАССЕЙНА РЕКИ ИРТЫШ ПО ДАННЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ УЧАСТКА ГЕНА *CYTB*

©2024 Жигилева О.Н.\*, Алямкин Г.В.\*\*

Лаборатория AquaBioSafe, Тюменский государственный университет, Тюмень, 625003, Россия  
e-mail: \*zhigileva@mail.ru; \*\*alyamkin.egor@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.11.2023. После доработки 30.03.2024. Принята к публикации 05.05.2024

Изучена изменчивость нуклеотидной последовательности гена цитохрома *b* мтДНК ротана-головешки (*Perccottus glenii*) из водоёмов бассейна р. Иртыш. Дана оценка генетического разнообразия инвазионных популяций ротана на юге Западной Сибири и в Северном Казахстане. Выявлено 10 гаплотипов мтДНК ротана, в том числе 9 – в Сибири и 2 – в Казахстане. В озёрах Бердюжского района Тюменской области и Северного Казахстана, с одной стороны, и других изученных водоёмах бассейна р. Иртыш, с другой, выявлены разные, довольно сильно различающиеся, гаплотипы мтДНК ротана. Полученные данные указывают на наличие разных источников инвазии ротана на юге Сибири и в Северном Казахстане.

**Ключевые слова:** ротан-головешка, биологические инвазии, популяции, полиморфизм, *Cytb*, приобретённый ареал.

DOI:10.35885/1996-1499-17-2-040-046

## Введение

Инвазия ротана-головешки *Perccottus glenii* Dubowski, 1877 (Perciformes: Odontobutidae) началась в XX в. и привела к значительному продолжающемуся расширению его ареала на севере Евразии [Reshetnikov, 2013; Rakauskas et al., 2016]. В 1980-е гг. ротан проник и в Западную Сибирь, заселив Обь-Иртышский бассейн, предположительно, через Южно-Уральский инвазионный коридор [Корляков, Нохрин, 2014]. Ротан, как один из самых успешных и агрессивных инвазионных видов, пользуется большим вниманием у исследователей, и частная генетика этого вида относительно хорошо изучена. Секвенирован полный митохондриальный геном ротана, в нативном ареале на северо-востоке Китая у ротана выявлены три филогенетические линии [Xue et al., 2013; Xu et al., 2014; Lv et al., 2020, Yang et al., 2020; Zhang et al., 2021]. Эти же линии обнаружены и в зонах инвазии в Европе [King et al., 2015; Grabowska et al., 2020]. Тем не менее, в ряде районов приобретённого ареала генетические исследования вида отсутствуют или фрагментарны. К таким рай-

онам относится и Сибирь, где генетические исследования пришлых популяций ротана проводились только с использованием мультислокусных ДНК-маркеров и требуют уточнений [Жигилева, Куликова, 2016; Алямкин и др., 2022]. В частности, сопоставление гаплотипов митохондриальной ДНК сибирских популяций ротана с европейскими должно помочь в прояснении вопросов об источниках инвазии и путях проникновения ротана за Урал, по которым в настоящее время нет единого мнения [Решетников, Чибилёв, 2009; Корляков, Нохрин, 2014]. Цель данной работы – изучить встречаемость митохондриальных гаплотипов в инвазионных популяциях ротана на юге Западной Сибири и в Северном Казахстане.

## Материал и методика

Для генетического исследования использованы образцы мышечной ткани 44 особей ротана-головешки. Сбор материала проводили в 2017 г. в р. Тобол и оз. Андреевское, в 2022 г. – в озёрах Песьяное, Долгонькое, Плоское в пределах Тюменской обл., а также в оз.

**Таблица 1.** Места сбора и количество исследованных особей.

№	Водоём	Год	Географические координаты (с. ш., в. д.)	Число особей	Число последовательностей
1	оз. Долгонькое	2021	55.9572, 68.5337	3	2
2	оз. Песьяное	2021	56.0282, 68.4565	7	7
3	оз. Плоское	2021	55.9570, 68.4994	9	8
4	оз. Малое Плоское (Казахстан)	2021	54.7605, 69.4953	9	8
5	оз. Андреевское	2017	57.0446, 65.7425	8	5
6	р. Тобол	2017	56.6560, 66.3453	8	4

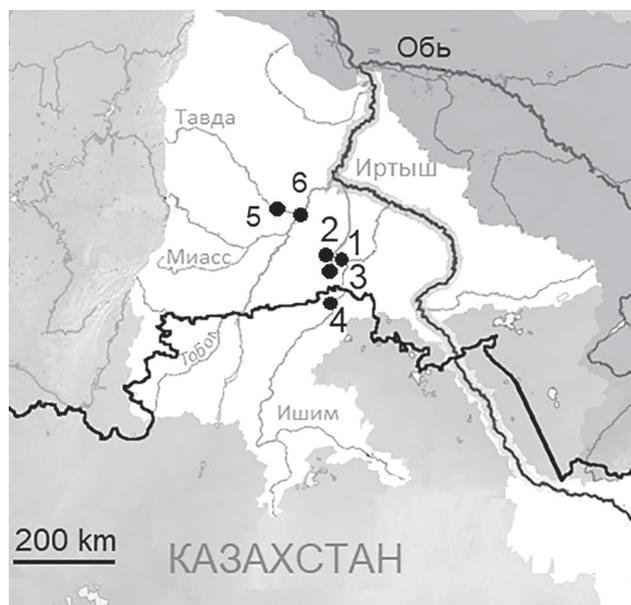
Малое Плоское в Кызылжарском районе на территории Казахстана (табл. 1). Все эти водоёмы относятся к бассейну р. Иртыш и входят в приобретённый ареал ротана (рис. 1).

Рыб отлавливали на удочку. Образцы мышечной ткани рыб фиксировали в 96%-м этаноле и хранили при температуре 20 °С. Выделение ДНК из тканей проводили с использованием набора реагентов ДНК-Экстрат-2 (Синтол, Москва).

Для изучения генетического полиморфизма использовали фрагмент гена *Cytb*. Для амплификации фрагментов исполь-

зованы специфические праймеры PCytbF 5'-AACCAGGACTAATGGCTTGA-3' на основе последовательности, полученной в исследовании [Yang et al., 2020] и Pro-R1-r 5'-TAGTTTAACTAAGAATTCTAGCTTTGG-3' на основе модифицированной последовательности, полученной в исследовании [Grabowska et al., 2020]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл 10x ПЦР буфера, содержащего MgCl<sub>2</sub> (20mM), 2 мкл dNTPs (2.5mM), по 0.7 мкл прямого и обратного праймера (10mM), 0.2 мкл Taq-полимеразы (5ед./мкл), 13.4 мкл H<sub>2</sub>O и 1 мкл (около 100 нг) раствора тотальной ДНК. Режим амплификации: 95 °С – 5 мин, 35 циклов (94 °С – 1 мин, 55 °С – 45 с, 72 °С – 1 мин), 72 °С – 7 мин, в соответствии с рекомендациями [Yang et al., 2020].

Качество ПЦР-продукта определяли путём электрофореза в 1.3%-м агарозном геле с добавлением флуоресцентного красителя бромистого этидия. Электрофорез проводили в течение 40 минут при напряжении 120 В. ДНК из гомогенного ПЦР-продукта пересаждали смесью этанола с ацетатом аммония по методике ЦКП «ГЕНОМ» [Метод..., 2023] с модификацией из-за большого объёма смеси (добавляли больший объём реагентов и дополнительное центрифугирование после осаждения). Концентрацию очищенной ДНК оценивали в сравнении с серией разведений короткой плазмиды pBR322 в ходе 1.2%-го агарозного гель-электрофореза с добавлением бромистого этидия. Секвенирование проводили методом капиллярного электрофореза на базе ИБВВ РАН с использованием набо-



**Рис. 1.** Места сбора особей ротана-головешки: 1 – оз. Долгонькое (Бердюжский район Тюменской обл.), 2 – оз. Песьяное (Бердюжский район Тюменской обл.), 3 – оз. Плоское (Бердюжский район Тюменской обл.), 4 – оз. Малое Плоское (Кызылжарский район, Казахстан), 5 – оз. Андреевское (Тюменский район), 6 – р. Тобол (Ялуторовский район Тюменской обл.). Светлая область – бассейн р. Иртыш.

ра BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit на автоматическом анализаторе ABI 3500 («Applied Biosystems», США/«Hitachi», Япония) согласно рекомендациям производителя.

Полученные последовательности выравнивали вручную с использованием программы MEGA7 [Kumar et al., 2016]. После выравнивания для анализа использовали 34 последовательности длиной 1101 н. п. Выявленные в ходе работы варианты последовательностей ротана депонированы в базу данных NCBI под номерами OR861548–OR861581. Для сравнения использовали последовательности гена *Cytb* ротана из Китая [Yang et al., 2020] и Европы [Grabowska et al., 2020], депонированные в GenBank под номерами: MG882513–MG882532, MN555819–MN555835, MN555836–MN555845, MN555847–MN555857, MN555859–MN555861, MN555863, MN555865–MN555958, MN555960–MN556019, MN556021–MN556037, MN556039–MN556051, MN556053–MN556057, MN556060–MN556063, MN556065–MN556085. Филогенетическое дерево построено по методу наибольшего правдоподобия и создано на основе модели замен Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) [Hasegawa et al., 1985] как наиболее подходящей. Отбор моделей проводили на основе Байесовского информационного критерия с помощью программы MEGA7. Показатели полиморфизма – нуклеотидное разнообразие ( $\pi$ ), разнообразие гаплотипов (Hd) и среднее число попарных различий между нуклеотидами ( $P_i$ ),

– получены с помощью программы DnaSP 6 [Librado, Rozas, 2009]. Сеть гаплотипов рассчитана и создана на основе модели HKY с помощью программы DnaSP 6, графическое изображение создано с помощью программы Network 10 [Bandelt et al., 1999].

### Результаты и обсуждение

Анализ последовательностей гена *Cytb* показал наличие 30 полиморфных участков, из них 20 содержат единичные замены (singleton variable sites), а 10 – двойные (parsimony variable sites, two variants). Среднее содержание нуклеотидов: А = 27.8%, Т = 34%, С = 23.2%, G = 15%. Гаплотипическое разнообразие (Hd) составило 0.506, нуклеотидное разнообразие ( $\pi$ ) – 0.0045. Наибольшие показатели разнообразия отмечены в выборке ротана из р. Тобол (табл. 2).

Всего по результатам секвенирования последовательностей гена *Cytb* ротана нами было выявлено 10 гаплотипов мтДНК, в том числе девять – в Сибири и два – в Казахстане. Наибольшее число гаплотипов (по четыре) отмечено в оз. Андреевское и р. Тобол. Во всех трёх исследованных озёрах Бердюжского района встречался только один гаплотип, в оз. Малое Плоское в Казахстане – два, с преобладанием гаплотипа H1 (табл. 3).

На основе модели HKY создана сеть гаплотипов по методу Neighbor-Joining (рис. 2). Все гаплотипы можно объединить в три гаплогруппы (клады) I–III. Отмечено значи-

**Таблица 2.** Показатели полиморфизма участка гена *Cytb* ротана-головешки из разных водоёмов на юге Западной Сибири и в Северном Казахстане.

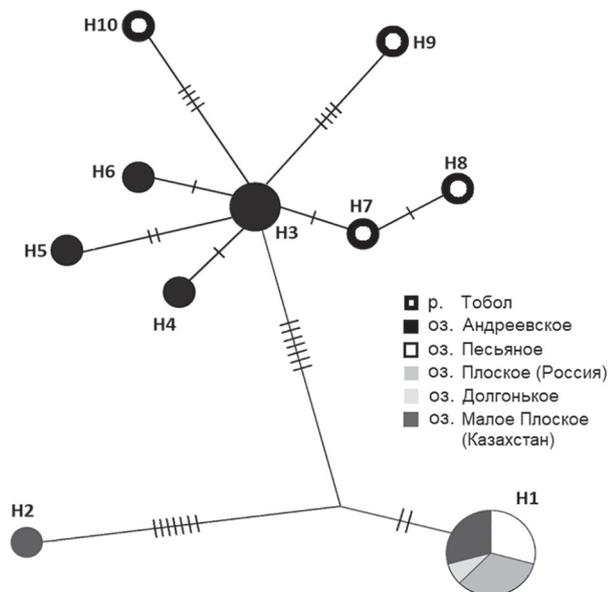
Водоём	V	Hd ± sd	$\pi$ ± sd	$P_i$ ± sd
оз. Долгонькое	0	0	0	0
оз. Песьяное	0	0	0	0
оз. Плоское	0	0	0	0
оз. Малое Плоское (Казахстан)	9	0.250±0.180	0.0020±0.0014	2.313±1.509
оз. Андреевское	4	0.900±0.161	0.0014±0.0011	1.600±1.281
р. Тобол	10	1.000±0.177	0.0046±0.0034	5.167±3.647
Всего	23	0.506±0.105	0.0045±0.0009	1.503±2.038

Обозначения: V – число вариабельных сайтов в исследуемом участке гена *Cytb*;  $P_i$  – среднее число попарных различий между нуклеотидами;  $\pi$  – нуклеотидное разнообразие; Hd – гаплотипическое разнообразие; sd – стандартное отклонение.

**Таблица 3.** Встречаемость гаплотипов гена *Cytb* мтДНК в выборках ротана.

Выборка	Число гаплотипов	Гаплотип	Число особей	Частота, %
оз. Долгонькое	1	H1	2	100
оз. Песьяное	1	H1	7	100
оз. Плоское	1	H1	8	100
оз. Малое Плоское (Казахстан)	2	H1	7	87.5
		H2	1	12.5
оз. Андреевское	4	H3	2	40
		H4	1	20
		H5	1	20
		H6	1	20
р. Тобол	4	H7	1	25
		H8	1	25
		H9	1	25
		H10	1	25

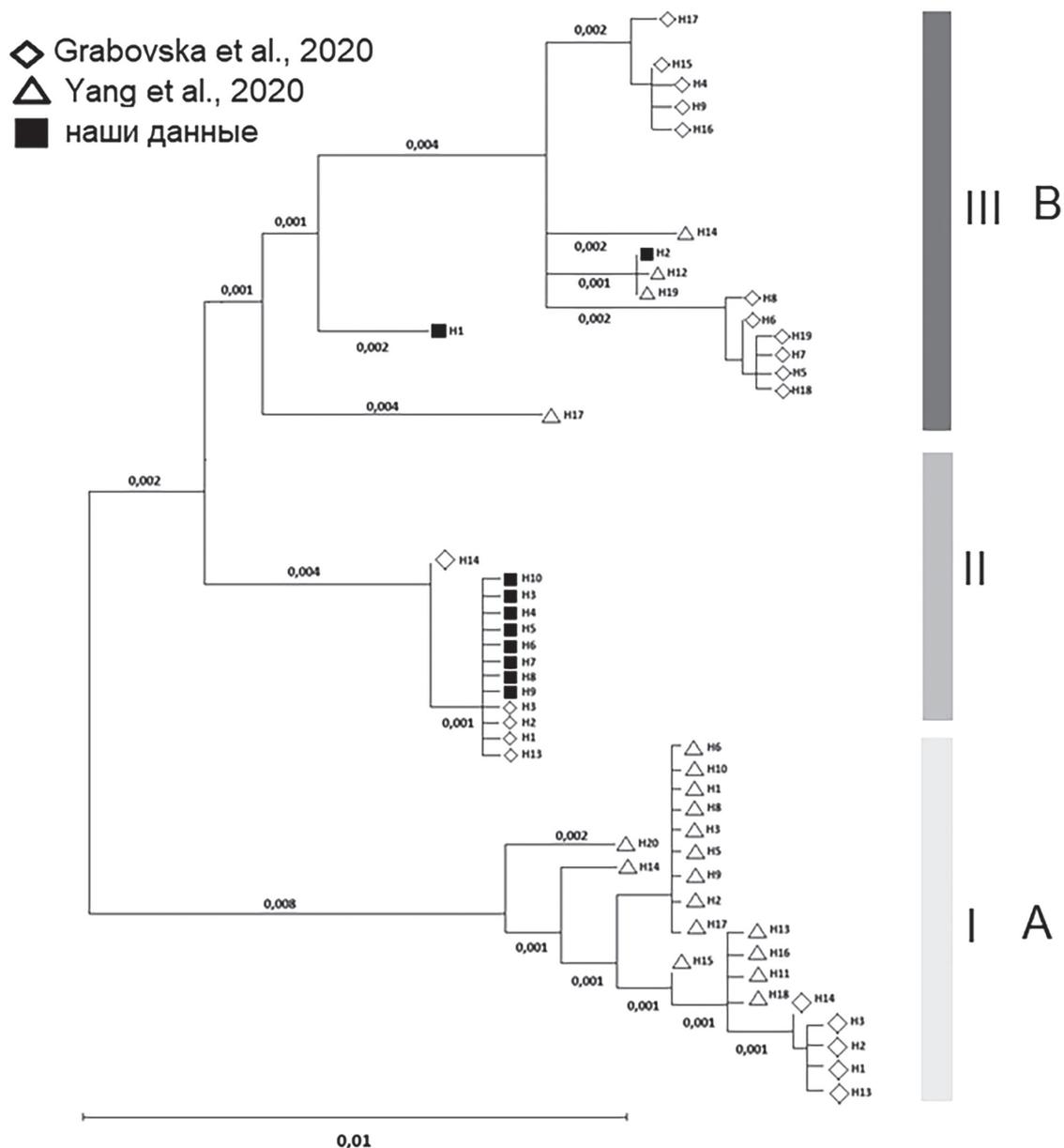
тельное генетическое расстояние между гаплотипами H1, H2 и остальными гаплотипами (H3–H10). Гаплотипы ротана из р. Тобол и оз. Андреевское на сети формируют отдельную, хорошо обособленную группу с характерной звёздчатой структурой. Наиболее частым и базовым в этой группе является гаплотип H3, обнаруженный у ротана оз. Андреевское, все остальные гаплотипы бассейна р. Тобол – производные от него. Звёздчатая структура свидетельствует о недавнем происхождении с последующим быстрым распространением ротана из одного источника инвазии.



**Рис. 2.** Сеть гаплотипов мтДНК (H1–H10), отражающая филогенетическую структуру популяций ротана-головешки (обозначены разным цветом). Размер кругов пропорционален количеству особей, количество насечек на осях – числу различающихся кодонов.

По методу наибольшего правдоподобия построено филогенетическое дерево, включающее последовательности из Европы [Grabowska et al. 2020] и Китая [Yang et al., 2020] (рис. 3). Гаплотипы H3–H9 из оз. Андреевское и р. Тобол проявляют значительное сходство с последовательностями гена *Cytb* ротана из европейских популяций, в частности, с гаплогруппой II, выявленной в Прибалтике, Беларуси, Украине, России и единственной, обнаруженной у ротана Волжского бассейна. Это подтверждает гипотезу о заселении ротаном бассейна Иртыша из Волжского бассейна через реки и каналы Южного Урала. Напротив, гаплотип H2, выявленный в оз. Малое Плоское в Казахстане, относится к другой гаплогруппе и имеет наибольшее генетическое сходство с гаплотипами ротана из Северного Китая. Интересно, что популяция ротана из этого изолированного озера имела наибольшие генетические дистанции от всех остальных изученных нами популяций данного вида.

Полученные данные могут указывать на наличие разных, как минимум двух, источников инвазии ротана в исследованной нами части бассейна р. Иртыш. Как было показано нами ранее [Алямкин и др., 2022], популяции ротана из р. Тобол, а также озёр бассейна этой реки проявляют значительное сходство между собой, и, поскольку все эти исследованные озёра проточные и связаны единой гидрографической сетью, популяции ротана могут быть результатом его естественного расселения. Более того, р. Иртыш через р. Тобол и его



**Рис. 3.** Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, на основе последовательностей фрагмента гена *Cytb* ротана. Клады А, В соответствуют клатам, выявленным в нативном ареале ротана – в Китае [Yang et al., 2020], клаты I–III выявлены в Европе [Grabowska et al., 2020].

притоки соединяется с уральскими реками и бассейном р. Волга за счёт искусственно сооружённых каналов. Ротан мог проникнуть в р. Тобол через этот Южно-Уральский инвазионный коридор наряду с другими вселенцами.

Другая ситуация наблюдается в озёрах Бердюжского района, а также оз. Малое Плоское на территории Казахстана. С одной стороны, выборки ротана из этих озёр генетически сходны между собой, имеют общий гаплотип мтДНК (H1). Эти озёра близко расположены, относятся к бассейну одной реки – Ишим, что объясняет сходство рыб. С другой стороны, озёра являются не проточными,

и попадание туда ротана произошло, скорее всего, с участием человека. Кроме того, учитывая значительные генетические дистанции, а также наличие совершенно других гаплотипов мтДНК у ротана из этих озёр по сравнению с выборками из бассейна р. Тобол, можно предположить наличие другого источника происхождения ротана в этой части бассейна Иртыша.

### Заключение

Таким образом, полученные данные по генетическому полиморфизму ротана бассейна р. Иртыш указывают на наличие раз-

ных источников инвазии этого вида на юге Сибири и в Северном Казахстане. В озёрах бассейна р. Ишим (Бердюжский район Тюменской обл. и Северный Казахстан), с одной стороны, и водоёмах бассейна р. Тобол, с другой, выявлены разные, довольно сильно различающиеся, гаплотипы мтДНК ротана. Причём тобольские популяции имеют большее генетическое сходство с волжской и другими европейскими популяциями этого вида, а ишимские – с северокавказскими популяциями.

### Благодарности

Выражаем благодарность Бушуевой П.А. и Колесникову И.П. (Тюменский государственный университет) за помощь в сборе материала; Боровиковой Е.А. (Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук) – за методические консультации и помощь в секвенировании.

### Финансирование работы

Исследование было выполнено при поддержке Правительства Тюменской области в рамках проекта Западно-Сибирского межрегионального научно-образовательного центра № 89-ДОН (2).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### Соблюдение этических стандартов

Статья не содержит исследований с участием животных в экспериментах, выполненных кем-либо из авторов. Были соблюдены национальные и внутриорганизационные принципы планирования и проведения исследований с использованием животных.

### Литература

Алямкин Г.В., Жигилева О.Н., Жохов А.Е. Генетическая изменчивость ротана *Perccottus glenii* и его паразита, цестоды *Nippothenia mogurndae*, за пределами естественного ареала // Биология внутренних вод. 2022. № 2. С. 181–191.

Жигилева О.Н., Куликова А.А. Особенности биологии и генетическая изменчивость ротана *Perccottus glenii* (Odontobutidae) в водоёмах Тюменской области // Вопросы ихтиологии. 2016. Т. 56. № 1. С. 77–85.

Корляков К.А., Нохрин Д.Ю. Тенденции возникновения инвазионного коридора Волга-Обь // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. 2014. № 2. С. 19–38.

Метод прямого переосаждения ДНК в мягких условиях. ЦКП «ГЕНОМ» (Электронный ресурс) // ([http://www.genome-centre.ru/downloads/NH4Ac\\_EtOH.pdf](http://www.genome-centre.ru/downloads/NH4Ac_EtOH.pdf)). Accessed on 24.11.2023.

Решетников А.Н., Чибилёв Е.А. Распространение ротана (*Perccottus glenii* Dybowski, 1877) в бассейне р. Иртыш и анализ возможных последствий для природы и человека // Сибирский экологический журнал. 2009. Т. 16. № 3. С. 405–411.

Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Medianjoining networks for inferring intraspecific phylogenies // Molecular Biology and Evolution. 1999. Vol. 16. P. 37–48.

Grabowska J., Kvach Yu., Rewicz T. et al. First insights into the molecular population structure and origins of the invasive Chinese sleeper, *Perccottus glenii*, in Europe // NeoBiota. 2020. Vol. 57. P. 87–107.

Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA // Journal of Molecular Evolution. 1985. Vol. 22. P. 160–174.

King T.L., Eackles M.S., Reshetnikov A.N. Rapid isolation of microsatellite DNAs and identification of polymorphic mitochondrial DNA regions in the fish rotan (*Perccottus glenii*) invading European Russia // Conservation Genetics Resources. 2015. Vol. 7. P. 363–368.

Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Molecular Biology and Evolution. 2016. Vol. 33. No. 7. P. 1870–1874.

Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. P. 1451–1452.

Lv W., Jiang H., Bo J. et al. Comparative mitochondrial genome analysis of *Neodontobutis hainanensis* and *Perccottus glenii* reveals conserved genome organization and phylogeny // Genomics. 2020. Vol. 112. No. 6. P. 3862–3870.

Rakauskas V., Stakėnas S., Virbickas T., Bukelskis E. Non-indigenous fish in the northern branch of the central European invasion corridor // Reviews in Fish Biology and Fisheries. 2016. Vol. 26. No. 3. P. 491–508.

Reshetnikov A.N. Spatio-temporal dynamics of the expansion of rotan *Perccottus glenii* from West-Ukrainian center of distribution and consequences for European freshwater ecosystems // Aquatic Invasions. 2013. Vol. 8. No. 2. P. 193–206.

Xu W., Yin W., Chen A. et al. Phylogeographical analysis of a cold-temperate freshwater fish, the Amur sleeper (*Perccottus glenii*) in the Amur and Liaohe River basins of Northeast Asia // Zoological science. 2014. Vol. 31. P. 671–679.

Xue W., Hou G., Li C. et al. Complete mitochondrial genome of Chinese sleeper, *Perccottus glenii* // Mitochondrial DNA. 2013. Vol. 24. P. 339–341.

Yang P., Hu Z., Liu Y. et al. Mitochondrial genetic diversity and population structure of the Amur sleeper (*Perccottus glenii*) in Northeast China // Pakistan Journal of Zoology. 2020. Vol. 52. No. 4. P. 1531–1539.

## GENETIC POLYMORPHISM OF INVASIVE POPULATIONS OF THE AMUR SLEEPER *PERCCOTTUS GLENII* (PERCIFORMES: ODONTOBUTIDAE) OF THE IRTYSH RIVER BASIN ACCORDING TO SEQUENCING OF THE *CYTB* GENE REGION

© 2024 Zhigileva O.N.\*, Alyamkin G.V.\*\*

AquaBioSafe Laboratory, Tyumen State University, Tyumen, 625003, Russia;  
e-mail: \*zhigileva@mail.ru; \*\*alyamkin.egor@yandex.ru

We studied the variability of the nucleotide sequence of the cytochrome *b* gene of the mtDNA of the Amur sleeper (*Percottus glenii* Dubowski, 1877) from water bodies of the Irtysh River basin. We assessed the genetic diversity of invasive populations of Amur sleeper in the south of Western Siberia and in northern Kazakhstan. We identified 10 mtDNA haplotypes in *P. glenii*, including 9 in Siberia and 2 in Kazakhstan. In the lakes of the Berdyuzhsky district of the Tyumen Region and Northern Kazakhstan, on the one hand, and in other studied water bodies of the Irtysh River basin, on the other hand, different haplotypes of the Amur sleeper mtDNA were identified. The data obtained indicate the presence of different sources of Amur sleeper invasion in southern Siberia and Northern Kazakhstan.

**Keywords:** Amur sleeper, biological invasions, populations, polymorphism, *Cytb*, acquired habitat.