
КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 575.86:574.9

**ОБНАРУЖЕНИЕ ГАПЛОТИПА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК,
ХАРАКТЕРНОГО ДЛЯ СИБИРСКОЙ РЯПУШКИ *Coregonus sardinella*
Valenciennes, 1848, В ПОПУЛЯЦИИ ЕВРОПЕЙСКОЙ РЯПУШКИ *C. albula*
(Linnaeus, 1758) ВОДЛОЗЕРА (БАССЕЙН БАЛТИЙСКОГО МОРЯ)**

© 2009 г. Е. А. Боровикова*, А. А. Махров**

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
152742 Ярославская обл., Некоузский район, пос. Борок

**Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991 Москва, ул. Губкина, 3

E-mail: elenalex1@yandex.ru, makhrov12@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2008 г.

Анализ последовательности нуклеотидов участка гена *ND-1* мтДНК позволил выявить в популяции ряпушки Водлозера (восточная часть бассейна Балтийского моря) вариант последовательности, близкий сибирской ряпушке. Таким образом, новые данные в совокупности с ранее полученными результатами морфологического и аллозимного анализа этой популяции позволяют говорить о вселении сибирской ряпушки в бассейн Балтийского моря во время последнего оледенения.

Хорошо известно, что в бассейнах Белого и Баренцева морей обитает целый ряд рыб сибирского происхождения, вселившихся туда, видимо, вскоре после отступления ледника (Кудерский, 1987). Эти данные подтверждены и дополнены в ходе ряда молекулярно-генетических исследований (Махров, Болотов, 2006).

В частности, морфологические исследования показали, что популяции ряпушки бассейна р. Печора занимают промежуточное положение между европейской и сибирской ряпушками, причем одни популяции из этого бассейна более сходны с одним видом, другие – с другим (Танфильев, 1896; Покровский, 1967; Соловкина, 1974; Решетников, 1980; Туманов, 2002). Для диагностики двух видов было предложено использовать гены *СК-1,2**, кодирующие фермент креатинкиназу (Perelygin, 1992), и тестирование рыб по этому локусу показало, что частоты аллелей в выборках ряпушки из бассейна Печоры также имеют промежуточные значения (Сендек, 1998).

В последние годы показано, что аллели *СК-1,2**, характерные для сибирской ряпушки, присутствуют с достаточно высокой частотой также в популяциях оз. Белого в бассейне Волги (Махров и др., 2003) и Водлозера в бассейне Балтийского моря (Боровикова и др., 2006). При этом в выборке из Водлозера нами обнаружен также и гаплотип митохондриальной ДНК (мтДНК), характерный для сибирской ряпушки. В то же время необходимо отметить, что в упомянутой работе нами был использован ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) анализ, который дает весьма ограниченную информацию о последовательности нук-

леотидов. Поскольку характерный для сибирской ряпушки гаплотип отличался от широко распространенного гаплотипа европейской ряпушки отсутствием только одного сайта рестрикции (для рестриктазы *Rsa I*), нельзя было исключить возможность, что данный гаплотип появился в популяции Водлозера в результате единичной обратной мутации.

Цель работы – подтвердить существование в прошлом потока генов из Сибири в популяцию современного Водлозера, для чего были проанализированы данные о полной нуклеотидной последовательности одного из участков мтДНК у особей из этой популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Водлозеро расположено на юго-востоке Карелии и принадлежит к бассейну Онежского озера. Это один из самых восточных водоемов водосбора Балтийского моря (рис. 1). Водлозеро отличается богатой и своеобразной ихтиофауной (Петрова, Кудерский, 2006).

Материал для исследования был собран в августе 2005 г. близ поселка Куганаволок. Отлов рыбы производился ставными сетями. Для анализа полиморфизма мтДНК ткани печени, мышц или жирового плавника фиксировали 96%-ным этанолом (1 : 5). Для секвенирования были взяты три образца ряпушки, из них два принадлежали к комплексному гаплотипу, широко распространенному у европейской ряпушки, и один – к гаплотипу, характерному для сибирской ряпушки.

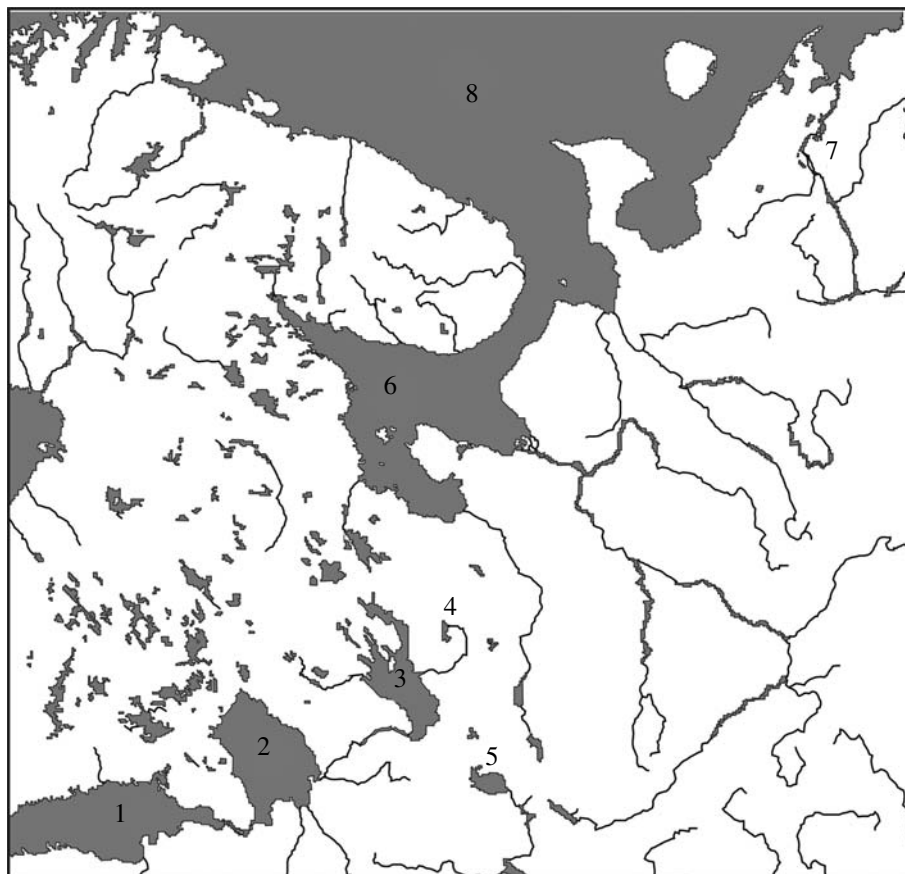


Рис. 1. Европейский Север России. 1 – Финский залив Балтийского моря; 2 – оз. Ладожское; 3 – оз. Онежское; 4 – Водлозеро; 5 – оз. Белое; 6 – Белое море; 7 – р. Печора; 8 – Баренцево море.

ДНК выделяли согласно общепринятой методике (Sambrook *et al.*, 1989). Последовательность нуклеотидов определяли для участка гена *ND-1* (кодирует субъединицу 1 НАДН-дегидрогеназного комплекса) мтДНК длиной 300 п.н., полиморфного у ряпушек. Для секвенирования использовали *ND-1* фрагмент, полученный при помощи праймеров, разработанных Крониным с соавт. (Cronin *et al.*, 1993):

LGL381: 5'-ACCCCGCCTGTTTACCAAAAACAT-3' – прямой;

LGL563: 5'-GGTTCATTAGTGAGGGAAGG-3' – обратный.

Синтез *ND-1* фрагмента проводили в 25 мкл буфера для амплификации (Бионем, Москва): 10 mM *трис*-HCl (pH 8.8); 50 ммоль KCl, 2.5 ммоль MgCl₂; 0.08% Nonidet P40. Смесь для амплификации содержала 100–300 нг тотальной клеточной ДНК, по 10–15 пмоль каждого из двух праймеров, по 200 нмоль каждого из четырех дезоксирибонуклеотидов и 0.5–1 ед. Таq-полимеразы (Бионем).

Программа амплификации включала этап первоначальной денатурации ДНК: 95°C – 5 мин; 32 цикла синтеза фрагмента: 95°C – 1 мин, 53°C –

50 с, 72°C – 1 мин 45 с, а также этап достройки концов: 72°C – 5 мин. Качество синтезированных образцов оценивали путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующей визуализацией ПЦР-продуктов в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием. Размер фрагмента определяли с помощью ДНК-маркеров 1 тыс. п.н. (Fermentas, Литва).

Определение первичной последовательности анализируемого участка *ND-1* фрагмента проводили на базе лаборатории ЕвроГен (Москва). Для секвенирования были использованы разработанные нами праймеры:

F2-1: 5'-CTTGGCTCAGGCTGGGCCTCT-3' – прямой;

R2: 5'-GCGCAAGGTGTCATAGGA-3' – обратный.

В дальнейшем мы анализировали участок *ND-1* гена, для которого последовательность была прочитана с обоих праймеров для всех образцов.

Для просмотра хроматограмм с результатами секвенирования и чтения нуклеотидной последовательности использовали программу SeqMan 4.00 (DNASTAR. Inc.).

	10	20	30	40	50	60	70	80
<i>C.lavaretus</i>	TTTGACCTCACAGAGGGGGA	ATCAGAACTAGTCTCTGGGT	TTAATGTAGAATACGCCGGA	GGACCCCTTCGCCCTTTT				
E-3	G.....							
S-1	G.....							
S-2	G.....							
	90	100	110	120	130	140	150	160
<i>C.lavaretus</i>	TCTGGCGGAGTATGCCAACA	TCCTCTCATAAATACGCTC	TCAACCATCTATTCTGGG	GGCATCACATATCCCCGCT				
E-3	T.....							
S-1	T.....							
S-2	T.....							
	170	180	190	200	210	220	230	240
<i>C.lavaretus</i>	TTCCCGAACTAACAGCCATA	AATCTAATAACAAAGCCGC	CCTATATCCGTAGTCTTTT	TATGAGTGGAGCCTCATAC				
E-3	.C.....						A.....	T
S-1	.C.....						A.....	
S-2	.C.....						A.....	
	250	260	270	280	290	300		
<i>C.lavaretus</i>	CCCCGCTTCGGTACGACCA	GCTCATACACCTTGTGAA	AAAGCTTCCTACCTATAACC					
E-3	T.....					G.....		
S-1	T.....					G.....		
S-2	A.....	T.....				G.....		

Рис. 2. Варианты нуклеотидных последовательностей участка гена *ND-1* мтДНК европейской и сибирской ряпушек в сравнении с последовательностью сига, митохондриальный геном которого секвенирован полностью (номер GenBank NC002646). E-3, S-2 – варианты последовательностей популяции ряпушки Водлозера; S-1 – вариант последовательности сибирской ряпушки из р. Индигирка (номер GenBank EU339155); 10–300 – позиции нуклеотидов. Точками обозначены совпадающие с последовательностью сига нуклеотиды.

Последовательности участка гена *ND-1* мтДНК ряпушки из оз. Водлозеро помещены в Международную базу данных GenBank под номерами EU339171-EU339173. Для сравнения в работе также использованы данные GenBank для следующих видов: *C. lavaretus* – NC002646; *C. albula* – EU256379, EU339159-EU339165, EU339174, DQ399869, DQ399870; *C. sardinella* – EU339150-EU339158.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенирование участка мтДНК, как и ожидалось, позволило выявить два варианта изучаемой последовательности – E-3 и S-2 (рис. 2). Вариант E-3 был характерен для обеих изученных особей с гаплотипом, распространенным в европейских водоемах; вариант S-2 выявлен у ряпушки с “сибирским” комплексным гаплотипом.

Вариант E-3, обнаруженный у двух ряпушек Водлозера, не уникален, но он имеет ограниченное распространение. Так, этот вариант присутствует в популяциях ряпушки из Онежского озера, р. Печора и Западного Ямала (EU339150-EU339153, EU339159, EU339163, EU339156). Вариант E-3 характеризуется наличием замены цитозина на тимин в положении 240 п.н. нашей последовательности, что соответствует позиции 3690 п.н. в последовательности полноразмерной мтДНК *C. lavaretus* (NC002646). Западнее Онежского озера данный вариант последовательности не найден (Kohlmann *et al.*, 2007; Боровикова, Артамонова, неопубликованные данные).

Как оказалось, S-2 отличается от E-3 тремя нуклеотидными заменами: в положениях 51, 240 и 246 п.н. (рис. 2). В то же время вариант S-2 отличался от нуклеотидной последовательности того же участка гена *ND-1* ряпушки из р. Индигирка

(EU339155) только одним нуклеотидом, в положении 246 п.н. Таким образом, оказалось, что вариант S-2 действительно является производным сибирского варианта (их разделяет всего одна мутация), а не европейского.

Судя по данным, имеющимся в GenBank, и публикации Кольманн с соавт. (Kohlmann *et al.*, 2007), в других изученных популяциях бассейна восточной и южной Балтики данный вариант последовательности не обнаружен. В то же время необходимо отметить, что анализ полиморфизма фрагмента гена *ND-3* и контрольного региона мтДНК ряпушки из оз. Брейтер Лужин (Breiter Luzin, Германия, бассейн Северного моря) выявил в этой популяции гаплотип, более сходный с гаплотипами *C. sardinella* из Северной Америки, чем с гаплотипами *C. albula* (Schulz *et al.*, 2006).

Следует отметить также, что возможность проникновения сибирской ряпушки в бассейны Балтийского и Каспийского морей обсуждается уже давно. Так, еще в первой половине XX в. ряд исследователей, опираясь на данные морфологического анализа, считали некоторые популяции из этих бассейнов подвидами сибирской ряпушки. Как подвида *C. sardinella vessicus* описана ряпушка оз. Белое в бассейне Волги (Дрягин, 1933). Покровский (1967) относил ряпушку Водлозера к подвида *C. sardinella maris-albi*. Однако необходимо учитывать, что четкого hiatus по морфологическим критериям между европейской и сибирской ряпушками в то время так и не было найдено (Покровский, 1967; Дрягин и др., 1969).

Позднее Решетниковым (1980) были выделены морфологические характеристики, позволяющие дифференцировать два вида ряпушек. По диагностическим признакам все ряпушки Северо-Запада России относятся к виду *C. albula* (Решетников,

1980). Однако, как показал анализ морфологии ряпушки из Водлозера (Боровикова и др., 2006), некоторые особи по одному из признаков, предложенных Решетниковым, соответствуют сибирской ряпушке.

Таким образом, анализ данных по трем группам маркеров (морфология, аллозимы и мтДНК) позволяет считать, что в формировании популяции ряпушки Водлозера приняла участие сибирская ряпушка. Факт расселения сибирской формы так далеко на запад представляет значительный зоогеографический интерес.

Палеогеографические реконструкции свидетельствуют о существовании сложных связей между приледниковыми водоемами на территории Европейского Севера во время последнего оледенения (Квасов, 1975, 1976; Mangerud *et al.*, 2004; Svendsen *et al.*, 2004). Сложная сеть приледниковых водоемов давала возможность разным видам рыб расселяться и контактировать. Один из возможных путей расселения сибирской ряпушки по европейским водоемам обсуждался в работе Кудерского (1977).

Авторы благодарны за помощь в сборе материала сотрудникам национального парка "Водлозерский" Л.П. Петровой и Е.В. Холодову; В.С. Артамоновой за финансовую поддержку, оказанную на этапе обработки материала.

Сбор материала проведен в рамках проекта РФФИ № 05-04-49232. Статья подготовлена при поддержке Программы фундаментальных исследований РАН "Биоразнообразие и динамика генофондов".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боровикова Е.А., Балдина С.Н., Гордон Н.Ю. и др. Генетическое разнообразие, особенности морфологии и происхождение ряпушки (*Coregonus*) Водлозера // Водлозерские чтения: Матер. науч.-практ. конф., посвященной 15-летию нац. парка "Водлозерский". Петрозаводск, 27–28 апреля 2006 г. Петрозаводск: Изд-во КНЦ РАН. 2006. С. 69–74.
- Дрягин П.А. Белозерская ряпушка и вопрос акклиматизации сиговых в Белом озере // Изв. ВНИОРХ. 1933. Т. 16. С. 22–39.
- Дрягин П.А., Пирожников П.Л., Покровский В.В. Полиморфизм сиговых рыб (*Coregonidae*) и его биологическое и рыбохозяйственное значение // Вопр. ихтиологии. 1969. Т. 9. Вып. 1. С. 14–25.
- Квасов Д.Д. Позднечетвертичная история крупных озер и внутренних морей Восточной Европы. Л.: Наука, 1975. 278 с.
- Квасов Д.Д. Происхождение котловины Онежского озера // Палеолимнология Онежского озера по колонкам донных отложений. Л.: Наука, 1976. С. 7–40.
- Кудерский Л.А. О путях проникновения сибирской ряпушки в водоемы Балтийского и Каспийского бассейнов // Изв. ГосНИОРХ. 1977. Т. 111. С. 54–62.
- Кудерский Л.А. Пути формирования северных элементов ихтиофауны Севера Европейской территории СССР // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. 1987. Вып. 258. С. 102–121.
- Махров А.А., Болотов И.Н. Пути расселения и видовая принадлежность пресноводных животных севера Европы (обзор молекулярно-генетических исследований) // Генетика. 2006. Т. 42. № 10. С. 1319–1334.
- Махров А.А., Политов Д.В., Коновалов А.Ф. и др. Гибридная популяция европейской (*Coregonus albula*) и сибирской (*C. sardinella*) ряпушек в верховьях Волги // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Тез. докл. междунар. конф. Сыктывкар, 11–15 февраля 2003 г. Сыктывкар. 2003. С. 56–57.
- Петрова Л.П., Кудерский Л.А. Водлозеро: природа, рыбы, рыбный промысел. Петрозаводск: НП "Водлозерский"; Ин-т озероведения РАН, 2006. 196 с.
- Покровский В.В. О морфологических особенностях, происхождении и географическом распространении беломорской ряпушки *Coregonus sardinella maris-albi* Berg // Изв. ГосНИОРХ. 1967. Т. 62. С. 100–114.
- Решетников Ю.С. Экология и систематика сиговых рыб. М.: Наука, 1980. С. 200–205.
- Сендек Д.С. О видовой принадлежности ряпушки, обитающей в реке Печоре // Сб. тр. ГосНИОРХ. 1998. Т. 323. С. 191–198.
- Соловкина Л.Н. Ряпушка *Coregonus albula sardinella* (Val.) бассейна Печоры // Вопр. ихтиологии. 1974. Т. 14. Вып. 5. С. 769–781.
- Танфильев Г.И. О рыбных и звериных промыслах в водах Мезенского и Печерского края // Вестн. рыбопромышленности. 1896. № 2–3. С. 53–64.
- Туманов М.Д. Особенности морфологии, темпа роста и возрастной структуры полупроходной и речной форм ряпушки *Coregonus albula* (L.) бассейна реки Печора // Тр. Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар, 2002. С. 137–143.
- Cronin M.A., Spearman W.J., Wilmot R.L. *et al.* Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products // Canad. J. Fish. Aquatic Sci. 1993. V. 50. P. 708–715.
- Kohlmann K., Kempter J., Kersten P., Sadowski J. Haplotype variability at the mitochondrial ND-1 gene region of *Coregonus lavaretus* from Polish lakes // Advanc. Limnol. 2007. V. 60. P. 47–57.
- Mangerud J., Jacobsson M., Alexanderson H. *et al.* Ice-dammed lakes and rerouting of the drainage of northern Eurasia during the Last Glaciation // Quaternary Sci. Rev. 2004. V. 23. P. 1313–1332.
- Perelygin A.A. Genetic variability of proteins in the populations of vendace (*Coregonus albula*) and least cisco (*Coregonus sardinella*) // Nordic J. Freshwater Res. 1992. № 67. P. 99.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.

Schulz M., Freyhof J., Saint-Laurent R. et al. Evidence for independent origin of two spring-spawning ciscoes

(Salmoniformes: Coregonidae) in Germany // J. Fish Biol. 2006. V. 68. P. 119–135.

Svendsen J.I., Alexanderson H., Astakhov V.I. et al. Late Quaternary ice sheet history of northern Eurasia // Quaternary Sci. Rev. 2004. V. 23. P. 1229–1271.

Detection of the Mitochondrial DNA Haplotype Characteristic of the Least Cisco (*Coregonus sardinella*, Valenciennes, 1848) in the Vendace (*C. albula*, Linnaeus, 1758) Population of Vodlozero (the Baltic Sea Basin)

E. A. Borovikova^a and A. A. Makhrov^b

^aPapanin Institute of the Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouzskii raion, Yaroslavskaya oblast, 152742 Russia

^bVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

e-mail: elenalex1@yandex.ru, makhrov12@mail.ru

Abstract—Analysis of the nucleotide sequence of the mitochondrial *ND-1* gene in the vendace population in lake Vodlozero (the eastern part of the Baltic Sea basin) revealed a sequence variant that is closely related to that of the least cisco of Siberia (the Indigirka River). Thus, together with the results of morphological and allozyme analysis of this population performed earlier, the results obtained in this study are suggestive of the immigration of the least cisco to the Baltic Sea basin during the last glaciation.