

**АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЩИПОВОК РОДА COBITIS
(COBITIDAE, CYPRINIFORMES) БАССЕЙНА Р. ДНЕПР НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ**

Левина Кристина Борисовна,

Гайдученко Елена Сергеевна,

Охременко Юлия Ивановна

ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам»

Levina Kristina, levin_kristina@biobel.by; Gajduchenko Helen, PhD, gajduchenko@tut.by; Okhremenko Yulia, okhremenko.yulia@yandex.by

Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources"

Аннотация. Щиповки рода *Cobitis* бассейна р. Днепр на территории Беларуси образуют 2 кластера: в первый кластер входят *C. elongatoides* и *C. tanaitica*, во второй кластер входит вид *C. taenia*. Предполагается обитание как гибридных особей, так и видов щиповок, ранее не описанных для исследуемого региона.

Ключевые слова: щиповка, *C. taenia*, *C. elongatoides*, *C. tanaitica*, гаплотипы, генетическое разнообразие

Щиповка обыкновенная (*Cobitis taenia*) – широко распространенный вид рыб, обитающий повсеместно в медленно текущих водах Европы, Азии, Африки и в том числе Беларуси [1]. В континентальных водоемах Европы насчитывается более 20 видов щиповок, составляющих более 50% видового разнообразия в роде *Cobitis*. Многие из этих видов были описаны лишь за последние 25 лет, а некоторые формы остаются неописанными до сих пор [2].

С появлением молекулярно-генетических методов исследований было установлено, что род *Cobitis* является одним из уникальнейших родов позвоночных животных, ввиду способности щиповок образовывать различные межвидовые гибридные ди-, три- и тетраплоидные формы, большинство которых представлены триплоидными клонально-гиногенетически размножающимися самками [3]. Доказательства гиногенетического размножения полиплоидных самок щиповок были получены с использованием спермы вьюна обыкновенного *Misgurnus fossilis* и подтверждены методами молекулярно-генетического анализа [3].

Данная работа представляет собой начальный этап исследований по уточнению видового и генетического разнообразия щиповок, обитающих в бассейне р. Днепр на территории Беларуси.

Цель работы – провести анализ генетического разнообразия щиповок рода *Cobitis* по фрагменту гена *cyt b*, обитающих в бассейне р. Днепр на территории Беларуси и сравнить полученные результаты с имеющимися данными в международном генетическом банке данных (NCBI GenBank).

В работе использован собственный ихтиологический материал щиповок (образцы мышечной ткани), собранный в мае 2022-23 года в результате полевых выездов. Образец ткани от каждой отловленной особи помещали в отдельную пробирку и хранили в 96% спирте при температуре -20°C.

ДНК выделяли с помощью набора «Нуклеосорб» комплектации С (Праймтех, Беларусь). Для получения целевого фрагмента использовалась пара праймеров гена *cyt b* L15267 (5'-AATGACTTGAAGAACCACCGT-3'); H15891 (5'-GTTTGATCCCGTTTCGTGTA-3') [4, 5].

Реакционная смесь для ПЦР содержала в 25 мкл: 200 мкМ dNTP, 0,5 мМ каждого праймера, 2,0 мМ MgCl₂, 1хПЦР-буфера, 1U Taq-полимеразы, 0,5 мкг ДНК-матрицы. Программа для амплификации: начальная денатурация 1 мин – 94°C; 30 циклов денатурации в течении 30 с – 94°C, отжиг 30 с – 55°C, элонгация 1 мин – 72°C; финальная стадия элонгации в течении 3 мин при 72°C.

Результаты амплификации анализировались при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Продукт ПЦР очищался при помощи ферментов экзонуклеазы и фосфатазы. Первичный анализ результатов секвенирования, редактирование и выравнивание последовательностей проводили в пакетах программ MEGA11. Для выравнивания последовательностей применяли алгоритм Muscle, с назначением штрафа за вставку пробелов – 400. Парсимониальные сети гаплотипов строили в программе PopArt.

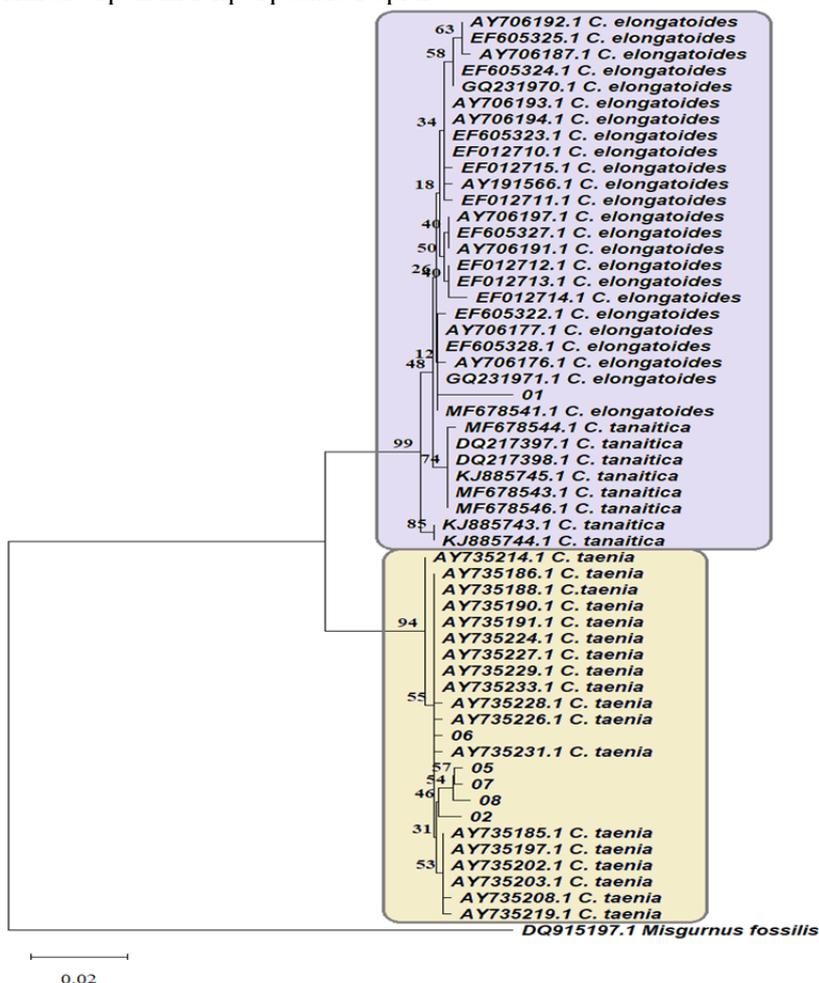


Рисунок 1. – Филогенетическое дерево видов рода *Cobitis*, построенное при помощи максимального правдоподобия (ML) для гена *cyt b*

Секвенирование провели в ЦКП «Геном» ГНУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» на 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Полученные образцы анализировали с образцами из NCBI GenBank.

Всего, помимо собственных расшифрованных нуклеотидных последовательностей щиповок, были использованы последовательности фрагмента гена *cyt b*, представленного в NCBI GenBank (суммарно в анализ включены последовательности из регионов Европы и Центральной Азии). Таким образом, в полный анализ для данной работы было включено 56 последовательностей фрагмента гена *cyt b* щиповки обыкновенной.

Для всех обнаруженных образцов было построено филогенетическое дерево (рис. 1).

Анализ филогенетического дерева, построенного на основании гена *cyt b* четко показывает наличие 2 основных кластеров: в первый кластер входят *C. elongatoides* и *C. tanaitica*, которые наиболее филогенетически близки между собой, в отдельный кластер входит вид *C. taenia*, который наиболее удален от видов первого кластера. В качестве внешней группы для укоренения использован вьюн обыкновенный (*Misgurnus fossilis*), который филогенетически наиболее отдален от щиповок. Из шести проанализированных образцов щиповок р. Днепр, 5 образцов относятся к щиповке обыкновенной (*C. taenia*), а 1 образец, согласно проведенным молекулярно-генетическим исследованиям, встроился в кластер *C. elongatoides* и *C. tanaitica*. Точная таксономическая идентификация данного образца будет проведена в последующих исследованиях

Для оценки частоты встречаемости и распределения гаплотипов была построена медианная сеть гаплотипов. По результатам проведенного анализа фрагмента гена *cyt b* у 56 особей щиповок обнаружено 30 гаплотипов, проанализированные образцы щиповок из р. Днепр Беларуси представлены 6 отдельными гаплотипами, не описанными ранее (рис. 2).

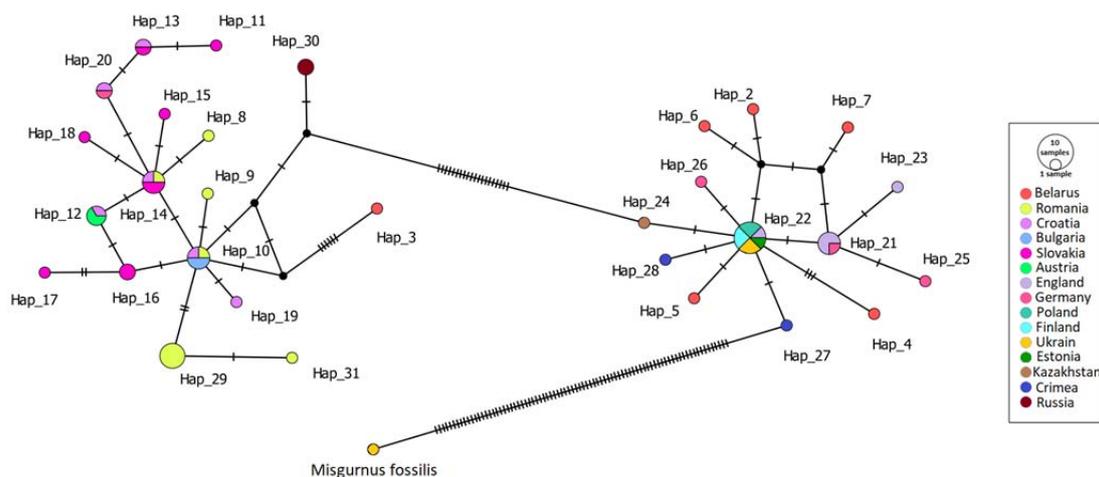


Рисунок 2. – Медианная сеть гаплотипов щиповки обыкновенной, обнаруженная в ходе анализа фрагмента гена *cyt b* (алгоритм MJN, PopArt)

Анализ сети гаплотипов, обнаруженный в ходе анализа фрагмента гена *cyt b* также показал наличие двух кластеров. В первый кластер вошли *C. elongatoides* и *C. tanaitica*, а во второй – *C. taenia*. В первый кластер входят 17 гаплотипов с образцами из Румынии, Хорватии, Болгарии, Словакии, Австрии, Англии, Германии и России и в том числе один гаплотип с нашим образцом (Hap_3). Во второй кластер входят 13 гаплотипов (образцы из Румынии, Англии, Германии, Польши, Финляндии, Украины, Эстонии, Казахстана, Крыма и в том числе 5 гаплотипов, принадлежащих нашим образцам (Hap_2, Hap_4, Hap_5, Hap_6, Hap_7). Следует отметить, что исследованные нами особи щиповки обыкновенной, обитающие в бассейне р. Днепр представлены уникальными, ранее не описанными гаплотипами, впервые отмеченными только в нашем исследовании.

Заключение. Исходя из полученных результатов анализа филогенетического дерева видов рода *Cobitis*, построенного при помощи метода максимального правдоподобия (ML) для фрагмента

гена *cyt b*, помимо щиповки обыкновенной установлено присутствие в бассейне р. Днепр особей, относящихся к кластеру *C. elongatoides* и *C. tanaitica*, точная таксономическая идентификация данных особей будет приведена в последующих исследованиях.

Из анализа медианной сети гаплотипов и филогенетического дерева видов рода *Cobitis* видно, что дунайская *C. elongatoides* и азовская *C. tanaitica* филогенетически ближе друг к другу, чем к обыкновенной щиповке *C. taenia*.

Щиповки рода *Cobitis* бассейна р. Днепр на территории Беларуси входят в 2 кластера: в первый кластер входят *C. elongatoides* и *C. tanaitica*, которые наиболее филогенетически близки между собой, во второй кластер входит вид *C. taenia*, который наиболее удален от *C. elongatoides* и *C. tanaitica*.

Межжерин С.В. и Павленко Л.И. отмечали постоянную гибридизацию между видами щиповок с образованием аллодиплоидных гибридов [6], и указали [7], что в образовании полиплоидных гибридов принимают участие три вида *C. elongatoides*, *C. taenia* и *C. tanaitica*. Можно предположить, что на территории Беларуси также могут обитать как гибридные особи, так и виды щиповок, ранее не описанные для исследуемого региона. Точная таксономическая идентификация щиповок на территории Беларуси будет проведена в последующих исследованиях.

Список использованных источников

1. Рыбы: популярный энциклопедический справочник / Под ред. П. И. Жукова. – Минск: Белорусская советская энциклопедия, 1989. – 310 с.
2. Шандиков, Г.О. К вопросу о видовом составе и некоторых особенностях биологии щиповок рода *Cobitis* (Teleostei: Cypriniformes: Cobitidae) в верхнем и среднем течении Северского Донца Украины / Г.О. Шандиков, Д.В. Кривохижа // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2008. – Вид. 8, № 828. – С. 91-118.
3. The gynogenetic reproduction of diploid and triploid hybrid spined loaches (*Cobitis*: Teleostei), and their ability to establish successful clonal lineages—on the evolution of polyploidy in asexual vertebrates / K Janko [et al.] // Genetica. – 2007. – № 131. – С. 185-194.
4. Briolay, J. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences / J. Briolay [et al.] // Molecular phylogenetics and evolution. – 1998. – Vol. 9, No. 1. – P. 100–108.
5. Janko, K. Evolutionary history of asexual hybrid loaches (*Cobitis*: Teleostei) inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation / K. Janko, P. Kotlik, P. Rab // J. Evol. Biol. – 2003. – №16. – P. 1280–1287.
6. Межжерин, С.В. Щиповки (Cypriniformes: Cobitidae: *Cobitis*) водоемов Украины: генетические границы видов и естественная гибридизация / С.В. Межжерин, Л.И. Павленко // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Біологія. – 2009. – Вип. 25. – С. 146-154.
7. Межжерин, С.В. Случай гибридизации у щиповок (Osteichthies: Cobitidae: *Cobitis*), обусловивший генетическую нестабильность и экспансию/ С.В. Межжерин, Л.И. Павленко // Цитология и генетика. – 2007. – Т.41, №4. – С. 26–35.