



## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Таксономическая идентификация хариусов (*Thymallus*) бассейна реки Енисей» содержит 44 страницы текстового документа, 10 иллюстраций, 2 таблицы и 53 использованных источника литературы.

**БАЙКАЛЬСКИЙ ХАРИУС, ВЕРХНЕЕНИСЕЙСКИЙ ХАРИУС, РЕКА ЕНИСЕЙ, ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДЕРЕВО.**

Целью магистерской работы являлось определение таксономической принадлежности выловленных из разных участков бассейна реки Енисей хариусов.

Задачи исследования:

1. Выделить геномную ДНК из имеющегося материала и проанализировать нуклеотидные последовательности контрольного региона митохондриальной ДНК.
2. Определить видовую принадлежность хариусов молекулярно-генетическим методом.

Деятельность различных предприятий, расположенных в бассейне реки Енисей, приводит к нарушениям в водных экосистемах, сказывающихся на состоянии ихтиофауны. В таких случаях нарушитель обязан возмещать ущерб, проводя мероприятия по восстановлению численности пострадавших видов. Однако зачастую при закупке на рыбопродуктовых заводах или вылове мальков, не уточняется, к какому виду они относятся, и соответственно, тот ли это вид, численность которого надо стабилизировать. Поэтому важно знать границы ареалов каждого вида, чтобы не допустить нежелательной гибридизации и межвидовой конкуренции.

В данной работе представлено 2 филогенетических дерева, отображающих таксономическую принадлежность выловленных на разных участках реки Енисей хариусов.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
1.1. Биология и экология рода <i>Thymallus</i> .....	6
1.2. Методы идентификации рыбы .....	10
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	20
2.1. Районы работ .....	20
2.2. Метод генетического анализа .....	23
3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	27
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	29
ВЫВОДЫ .....	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	33

## ВВЕДЕНИЕ

Рыбы отряда Salmoniformes представляют собой наибольший экономический, экологический и эволюционный интерес среди всей ихтиофауны пресноводных водоёмов умеренного пояса. Среди них род *Thymallus* получает всё большее внимание. Тем не менее, даже основной вопрос о том, сколько видов содержит род, или о широте разнообразия внутри каждого вида, остаётся без ответа [25]. В 2009 году Книжин И. Б. и Вайс С. Дж. выделили новый вид хариуса – *Thymallus svetovidovi* [5] – верхнеенисейский хариус. Таким образом, было подтверждено наличие трех видов хариуса в бассейне р. Енисей: байкальский хариус – *Thymallus baicalensis*, верхнеенисейский хариус – *Thymallus svetovidovi* и сибирский хариус – *Thymallus arcticus*. Тем не менее, однозначных границ обитания видов хариусов в реке Енисее и его притоках нет.

Интерес к точным моделям родства между видами и границами их распространения мотивирован прикладными вопросами, связанными с рыболовством и сохранением, а также фундаментальными исследованиями, включающими эволюционные процессы, которые регулируют диверсификацию и поддержание видов.

Пресные воды уязвимы к антропогенным воздействиям, включая утрату среды обитания, изменения климата, землепользования, загрязнения и биологические инвазии (причем как естественные, так и искусственные) – например возмещение ущерба предприятиями.

Деятельность различных предприятий, расположенных в бассейне реки Енисей, приводит к нарушениям в водных экосистемах, сказывающихся на состоянии ихтиофауны. В таких случаях нарушитель обязан возмещать ущерб, проводя мероприятия по восстановлению численности пострадавших видов. Однако зачастую при закупке на рыбопроизводных заводах или вылове мальков, не уточняется, к какому виду они относятся, и соответственно, тот ли это вид, численность которого надо стабилизировать. Поэтому важно

знать границы ареалов каждого вида, чтобы не допустить нежелательной гибридизации и межвидовой конкуренции.

Целью магистерской диссертации являлось определение таксономической принадлежности выловленных из разных участков бассейна реки Енисей хариусов.

Задачи исследования:

1. Выделить геномную ДНК из имеющегося материала и проанализировать нуклеотидные последовательности контрольного региона митохондриальной ДНК.
2. Определить видовую принадлежность хариусов молекулярно – генетическим методом.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Биология и экология рода *Thymallus*

Рыбы семейства Salmonidae имеют наибольший экономический, экологический и эволюционный интерес среди ихтиофауны всех умеренных пресноводных вод. Среди них роду *Thymallus* уделяется все больше внимания. Особенно в Евразии, как благодаря достижениям в фундаментальных исследованиях естественного отбора, так и в связи с опасениями серьезного сокращения численности ихтиоценоза [25].

Систематика хариусов, обитающих в бассейне реки Енисей:

- Класс: Actinopterygii – лучеперые рыбы
- Отряд: Salmoniformes – лососеобразные
- Семейство: Salmonidae – лососевые
- Подсемейство: Thymallidae – хариусовые
- Род: *Thymallus* – хариусы (Cuvier, 1829)
- Вид *Thymallus sp.* [13,37]

*Thymallus thymallus* – европейский хариус - широко распространен на территории Европы, от Южной Франции до Балкан вплоть до реки Люба в Черногории, и от Великобритании до Полярного и Приполярного Урала, от Скандинавии и тундры на севере до Балканского п-ова. В водотоках и водоёмах Крайнего Европейского Северо-Востока хариус обитает в трёх формах – речной, озёрно-речной и озёрной. Группы первой формы обитают только в реках, другие заходят из рек в озёра на нагул, третьи постоянно обитают в озёрах [20], в питании преобладают падающие в воду насекомые. Речные популяции обладают ярко выраженным хомингом. Весной и осенью хариус совершает местные, хотя и довольно протяжённые сезонные миграции – до нескольких десятков километров [15], временно переходя с территориального на стайный образ жизни [31]. В настоящее время данный вид является наиболее изученным как с экологической стороны, так и с генетической.

*Thymallus grubii* – верхнеамурский хариус – рыба среднего размера (около 30 см), относится к речному экотипу, предпочитает горные притоки, для этого вида также характерен хоминг (Чувство вод родной реки). Питается личинками и имаго поденок, ручейников, веснянок, чешуекрылых и другими насекомыми, во время нереста дальневосточных лососей поедает вымытую икру [22]. Обитает в бассейне Амура. В реке Буряя обитает в симпатрии с двумя другими видами: нижнеамурским хариусом и бурейским хариусом [1].

*Thymallus burejensis* - бурейский хариус, считается эндемиком верховьев реки Буряя, отловлен в реках Тырма, Серегекта, Ушман. Нижняя граница распространения – река Обдерган, верхняя – ключ Корбохон. Самый крупный хариус бассейна реки Амур, помимо насекомых также может питаться мелкими млекопитающими [1]. Данный вид тесно связан с сибирским хариусом и байкало-ленским хариусом, предполагается, что бурейский хариус эволюционировал отдельно в Бурейском водосборе (или в любом близлежащем, который впоследствии был объединен с Бурейским дренажем).

*Thymallus tugarinae*— нижнеамурский хариус. Встречается во всех реках в среднем и нижнем течении Амура и нескольких прибрежных осушительных реках, включая северо-запад острова Сахалин. По экологии схож с верхнеамурским хариусом, с которым обитает в симпатрии в реках Тырма, Дубликан, Ургал [1]. Вид, репродуктивно изолированный и легко отличимый от симпатрического *T. flavomaculatus*, первоначально был описан как подвид амурского хариуса.

*Thymallus grubii flavomaculatus* – желтопятнистый хариус, так же широко распространен на обширном водосборе верхнего Амура, включая все притоки, крупный вид (около 40 см). Несмотря на значительные морфологические различия, сходство по ДНК не позволяет считать желтопятнистого и верхнеамурского хариуса разными видами. Помимо верховьев Амура найден также в больших реках бассейнов нижнего Амура и Японского моря [2].

*Thymallus brevirostis* – монгольский хариус – в реках и озерах северо-западной Монголии. Этот вид обычно описывается как крупнорастущий рыбоядный обитатель бедных озер. В водоемах Центрально-Азиатского бассейна и реке Кобдо обитают две формы монгольского хариуса: хищная и бентосоядная форма, хищники более крупных размеров. Невзирая на то, что эти формы имеют разные размеры и другие внешние различия, генетическое единство подтверждает их принадлежность к одному виду [28].

*Thymallus brevicephalus* – короткоголовый или маркакольский хариус имеет ограниченное распространение. Обитает в озере Маркаколь, а также в прилегающих притоках, впадающих с гор Алтая в Иртыш, хотя точная степень его распространения точно не известна. Он является сестринской линией монгольского хариуса, но в отличие от *T. brevirostris*, у него отсутствуют зубы или большие челюсти, и он является довольно мелким хариусом [53].

В бассейне реки Енисей в настоящее время выделяют 3 вида хариуса: *Thymallus baicalensis* – байкальский хариус, *Thymallus arcticus* – сибирский хариус и *Thymallus svetovidovi* – верхнеенисейский хариус или хариус Световидова [24].

*Thymallus arcticus* – сибирский хариус, широко распространен на территории Сибири и за её пределами: от бассейна Печоры до Чукотки и Северной Америки. Неприхотлив в пище, и в основном питается насекомыми, при недостатке зообентоса переходит к хищничеству [26]. Систематика этого вида является наиболее сложной среди всех видов данного рода. В настоящее время подтверждено наличие восьми подвидов, шесть из которых встречаются на территории Сибири.

В бассейнах рек Кара, Обь, Енисей и Кобдо обитает подвид *Thymallus arcticus arcticus* (Pallas, 1776) – западносибирский хариус; бассейны рек Пясины, Таймыр, Хатанга, Лена, Колыма и др. населяет *Thymallus arcticus pallasi* (Vallenciennes, 1848) – восточносибирский хариус; *Thymallus arcticus mertens* (Vallenciennes, 1848) – камчатский хариус, обитает в реках Камчатка,

Пенжина, Анадырь. Также различают черного и белого байкальских хариусов - *Thymallus arcticus baicalensis* (Dybowski, 1874) и *Thymallus arcticus brevipinnis* (Svetovidov, 1931). *Thymallus arcticus grubii* (Dybowski, 1869) - амурский хариус, живет в бассейне Амура, в реках, стекающих с восточного склона Сихотэ-Алиня на юг до р. Судзухе, а также в реках по западному и северному берегам Охотского моря от Уды до Гижиги. *Thymallus arcticus signifer* (Richardson, 1823) - аляскинский хариус, в России имеет ограниченный ареал (оконечность Чукотского полуострова). Также описан еще один подвид *Thymallus arcticus nigrescens* (Dorogostaisky, 1923) - хубсугульский (косогольский) хариус, который является эндемиком озера Хубсугул, расположенного в верховьях реки Енисей [30, 34]. Было высказано предположение, что этот вид является экотипом байкальского хариуса.

*Thymallus baicalensis* – байкальский хариус. Одни исследователи [10] выделяют данного хариуса в отдельный вид, другие [11,21] отмечают его как подвид сибирского хариуса - *Thymallus arcticus baicalensis*. Считается эврифагом, питается как водными, так и воздушно-наземными насекомыми, также, преимущественно зимой питается рыбными объектами. Широко распространенный хариус, обитающий на большей части стока реки Енисей, включая озеро Байкал и верховья реки Селенги в северной Монголии. Было установлено, что нынешнее распространение байкальского хариуса является результатом катастрофического палеогидрологического события. Озеро Байкал было колонизировано из дренажа реки Енисей после прорыва реки Ангары между 110 000 и 130 000 лет назад [52].

*Thymallus svetovidovi* – верхнеенисейский хариус. Этот вид обитает в верхней части реки Енисей в Туве и Монголии. Также был обнаружен в 2013 г. при исследовании фауны Зулумайского заказника в Зиминском районе Иркутской области в р. Зима (бассейн р. Ока), в 2019 г. этот хариус отмечен в р. Тойсук (бассейн р. Китой). Вид отмечается в верхних предгорных и горных участках, спускаясь в нижерасположенные станции лишь в осенний период для зимовки. Биология вида практически не изучена [10].

Род хариус предоставляет уникальную возможность изучить ряд эволюционных и экологических концепций, включая механизмы видообразования [33], эволюцию сложных историй жизни [40,41], роль гибридизации в эволюции [49], закономерности эволюции хромосом [43] и дупликации генома [44]. Для решения этих эволюционных явлений необходима комплексная филогения и генетическая экспертиза лососёвых для проведения соответствующего сравнительного анализа биологического разнообразия [42].

В течение последнего десятилетия филогеографические исследования европейских пресноводных рыб на молекулярной основе значительно расширили наши знания о региональной систематике и зоогеографии и предоставили новый инструмент, помогающий разграничить и контролировать запасы в целях сохранения [50].

Тем не менее, знание распределения ихтиоценоза является жизненно важным для эффективного управления и устойчивости этого промысла.

## **1.2. Методы идентификации рыбы**

В связи с активным развитием аквакультуры в настоящее время выращивается около 60% рыбы и моллюсков, потребляемых человеком. Достаточно часто выращиваемые рыбы являются гибридами, например тилапии, сомы и карпы. К тому же в естественных условиях гибридизация между близкородственными видами рыб - обычное явление. Это может существенно усложнить задачу идентификации видовой принадлежности рыбы.

На данный момент времени накопилось множество различных методов идентификации рыбы, каждый из которых имеет свои недостатки и преимущества.

Существует несколько электрофоретических методов, таких как крахмал-гель, зонный электрофорез, акриламид-дисковый электрофорез, тонкослойная полиакриламид-гель изоэлектрическая фокусировка и электрофорез в полоске ацетата целлюлозы, принятых в качестве

официальных методов Ассоциацией официальных химиков - аналитиков для дифференциации видов морепродуктов или продуктов из них [21]. Есть также информация о возможности применения таких методов, как капиллярный зонный электрофорез, жидкостная хроматография [23] и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [24]. При применении данных методов можно использовать свежие или замороженные ткани. В электрофоретических методах анализируются белки, поэтому интенсивная термическая обработка может нарушить целостность белков, что может сделать анализ с использованием вышеперечисленных методов неэффективным [21]. К тому же, эти методы являются трудоемкими, требуют сложного дорогостоящего оборудования и используются в основном для идентификации морепродуктов.

В целом, хроматографические и электрофоретические методы полезны для идентификации видов рыб [42]. Однако хоть они и представляют значительную ценность в некоторых случаях, эти методы не подходят для рутинного анализа проб, поскольку они относительно дороги, как уже указывалось, трудоемки и сложны в выполнении. Поэтому, в последние несколько лет идентификация видов рыб проводилась в основном с помощью генетических [44] и иммунологических методов [45].

Среди иммунологических методов ИФА (иммуноферментный анализ) является наиболее широко используемым методом. Иммунологические методы, подобные ИФА, позволяют однозначно идентифицировать образцы рыб. Он широко используется в выявлении фальсификации видов рыбы. Методы ИФА обладают большими преимуществами по сравнению с другими аналитическими методами: (1) анализы просты в выполнении, чувствительны и специфичны; (2) они не требуют использования сложных аппаратов; и (3) простота процедуры и короткое время, необходимое для анализа, делают их пригодными для целей полевого скрининга в инспекционных программах [33].

Иммуноферментный анализ (ELISA) также является одним из методов анализа белков, который может оказаться полезным при работе с термически стерилизованными продуктами и используется для идентификации некоторых видов рыб [16].

Тем не менее, не все исследователи считают, что данные методы являются оптимальными.

Ранние методы, основанные на анализе макромолекул, такие как электрофоретическая и иммунологическая идентификация [45], демонстрировали свои собственные ограничения. Например, белки, представляющие аналитический интерес, часто денатурируются при нагревании и / или обработке, являются тканеспецифичными и подвержены загрязнению, что делает эти методы сложными для интерпретации и трудно воспроизводимыми [6;47].

Эти методы, как правило, были маломасштабными, разрабатывались на индивидуальной основе различными исследовательскими группами и применялись только к небольшим группам видов [6]. Хотя в некоторых исследованиях сообщалось об использовании иммуноферментных анализов для термически обработанных морепродуктов, этот метод не работает с близкородственными видами и требует разработки видоспецифичных антител [19;33].

Более широко распространены методы на основе анализа ДНК. Несмотря на то, что молекулы ДНК могут деградировать во время обработки, они более устойчивы и термостабильны, чем белки. Кроме того анализ ДНК может дать больше информации из-за вырожденности генетического кода и наличия некодирующих областей. Тогда как белки изменяются в зависимости от возраста организма и типа ткани, ДНК практически не зависит от этих факторов. К тому же ДНК можно выделить практически из любого субстрата, так как она присутствует почти во всех типах клеток организма.

Все это приводит к тому, что огромные достижения в молекулярной биологии, дали возможность идентифицировать любой вид рыбы практически по любому виду ткани, например мышцам, плавникам или крови.

Весьма надежным способом идентификации позвоночных животных являются методы молекулярной генетики, из которых самым популярным является баркодинг. ДНК-баркодинг подходит для всех жизненных стадий, и даже для тканей, подвергшихся значительной деградации. Метод основан на существовании видоспецифичных различий в короткой стандартизованной митохондриальной последовательности участка гена субъединицы I цитохром с оксидазы (COI) – баркоде, и успешно применяется для видовой идентификации рыб. Баркоды для разных видов собраны в обширные базы данных (NCBI Genbank, Boldsystems), по информации которых можно установить принадлежность неизвестного образца. Как правило, последовательности COI представителей одного вида отличаются друг от друга не более чем на 0,5-1%, в то время как баркоды близких, но разных видов имеют отличия 2% и более. Другим общепринятым маркером является участок гена цитохрома b (Cytb).

ДНК-баркодинг как метод видовой идентификации подходит для тех таксонов, для которых известна генетическая вариабельность COI между ближайшими видами и внутри одного вида. Идентификация будет успешной, если существует «зазор» между максимальной внутривидовой вариабельностью и минимальной межвидовой дистанцией.

Геном митохондрий позвоночных животных довольно компактен, он представлен кольцевой ДНК размером 16-17 тысяч пар нуклеотидов, а состав входящих в него генов крайне консервативен [47]. Митохондриальный геном включает 13 генов, кодирующих белки, 2 гена, кодирующих транспортные РНК, 2 гена рибосомальных РНК и 2 некодирующих участка, одним из которых является контрольный регион или D-петля. Генетические маркеры митохондриальной ДНК - последовательность участка гена субъединицы I

цитохром с оксидазы (COI), участок гена цитохрома b (Cytb), один из двух некодирующих участков мтДНК контрольный регион или D-петля, также часто в исследованиях используется фрагменты генов мтДНК NADH – дегидрогеназы (ND-фрагменты).

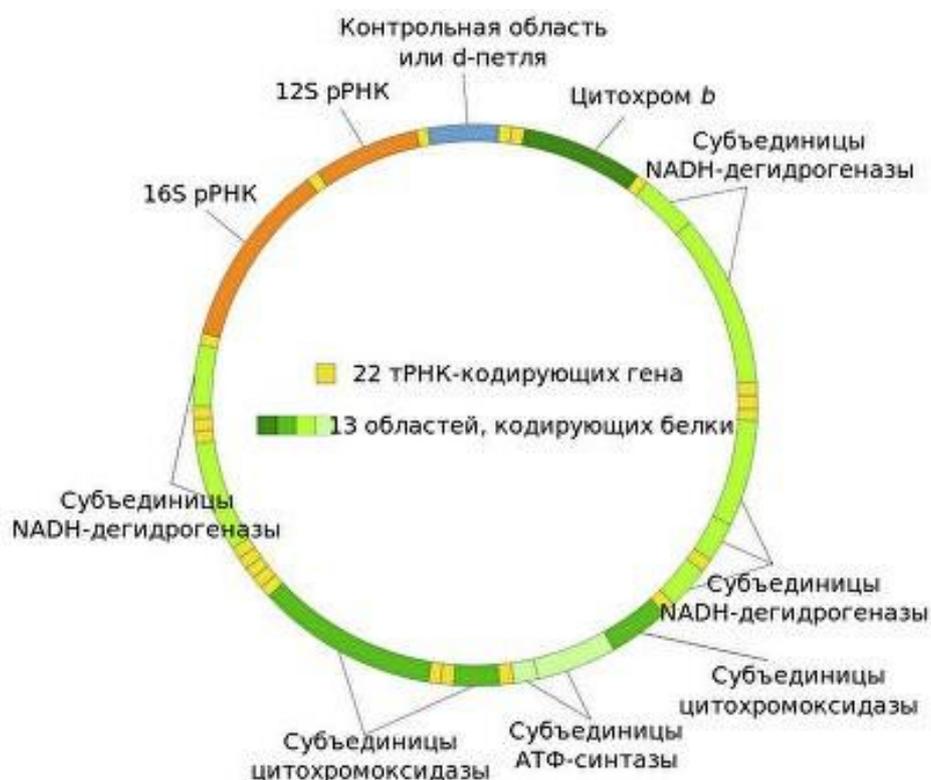


Рисунок 1 – Митохондриальная ДНК [12].

Участок (первая половина) гена субъединицы I цитохром с оксидазы - COI – фрагмент, длиной примерно 500-600 пар нуклеотидов. Маркер используется для беспозвоночных и позвоночных животных.

В работе по изучению микроэволюционных процессов у угольной рыбы *Anoplopoma fimbria* на основании данных о полиморфизме, секвенирование участка гена COI показало, что в процессе микроэволюционных изменений глобальная дивергенция отсутствовала. Ее наличие могло привести к образованию изолированных группировок угольной рыбы, которые в настоящий момент не контактируют между собой [29].

В исследовании изменчивости окраски *Lycodes yamato* как признака межвидового различия, анализировали последовательности фрагмента гена

COI у этих 24 особей. Полученные перекрывающиеся нуклеотидные основания (594 н.о.) оказались практически идентичными и никак не коррелировали с типом окраски. Выявлен лишь один отличающийся нуклеотид у одной особи, однако эта замена не влияет на состав транслируемого белка [3].

В исследовании полиморфизма ряпушек (*Coregonus sp.*) использовали гены ND1 и COI. Результаты секвенирования показали, что полиморфизм COI в популяциях ряпушки разных водоёмов, удалённых друг от друга географически, с разной экологией, филогенетически кажутся ближе друг к другу, в сравнении с результатами анализа полиморфизма ND1-фрагмента. Это объясняется тем, что у данных маркерных фрагментов мтДНК разная скорость накопления мутаций. ND-гены имеют скорость эволюции в 2-3 раза больше, чем гены цитохром оксидазы и тРНК [7].

ND – фрагменты генов мтДНК кодирующих субъединицы NADH - дегидрогеназного комплекса. 3 субъединицы NADH1, NADH2 и NADH3, и фрагментов соответственно три (ND1, ND2 и ND3). Чаще всего в исследованиях используется фрагмент ND1 длиной примерно 2050 пар нуклеотидов. Данный маркер успешно применяется в работах по изучению особенностей полиморфизма видов и филогенетических взаимоотношений между видами Ряпушек (*Coregonus sp.*) [8].

В работе по определению систематического положения и происхождения сига Европы использовали маркерные фрагменты ND1 и ND3. При изучении первичных последовательностей ND3-фрагмента было доказано существование трёх группировок сига различного происхождения на территории Европы. Результаты изучения фрагмента ND1 позволили выделить в Европейском Севере России две качественно различающиеся группы сига. Однако многолетние исследования данного фрагмента не позволили выявить маркеры, которые однозначно разделили бы виды Сибирской и Европейской ряпушки [9].

В работе по изучению изменчивости гена цитохрома b митохондриальной ДНК в популяциях кеты отмечен полиморфизм гена cyt**b**

мтДНК. Обнаружено 9 гаплотипов, из этих вариантов лишь 5 были общими для обеих популяций. Высокий «хоминг» по мнению авторов, возможно, является главной причиной генетических отличий между популяциями кеты различных водоемов. Не смотря на положительный результат работы, отмечена важность более детального исследования с использованием других генетических маркеров [4].

Авторы [36] в своей работе провели сравнительный анализ двух видов хариуса по данным секвенирования гена *Cytb*. Полученные результаты свидетельствуют о значительной дивергенции хариусов *Thymallus tugarinae* и *Thymallus flauomaculatus* Дальнего Востока России, сопоставимой с межвидовым уровнем. Помимо дивергенции межвидовое различие также выражается в наличии фиксированных аминокислотных замен при попарном сравнении последовательностей *Cytb* разных видов друг с другом. Авторы предполагают, что дивергенция с представителями остальных филогенетических линий произошла значительно раньше, чем дивергенции между данными видами. Для подтверждения этой гипотезы необходимо применения маркеров ядерной ДНК.

При исследовании изменчивости окраски *Lycodes yamatoi* как возможного признака видового различия в участке последовательности гена *Cytb* размером в 993 нуклеотидных основания у большинства исследованных рыб генетических отличий не обнаружено. В двух образцах была найдена изменчивость. У одной особи имелся один отличающийся нуклеотид. Данная мутация является несинонимичной транзицией, которая приводит к замене в транслируемом белке изолейцина на треонин. У другой особи в этом фрагменте имелось 5 отличающихся нуклеотидов. Все отмеченные мутации являются транзициями, одна из которых приводит к замене в белке изолейцина на валин. В этой работе также использовали последовательности фрагмента гена *COI*, однако результаты (описанные выше) оказались менее значительными [3].

Контрольный регион (D-петля) – некодирующая последовательность мтДНК, относительно быстро накапливающая замены, длина фрагмента около 1000 пар нуклеотидов. Результаты исследований в работе по определению разнообразия гаплотипов контрольного региона мтДНК европейского хариуса выявили 10 гаплотипов, 8 из которых были описаны впервые. На основе полученных данных было установлено, что все гаплотипы относятся к скандинавской филогенетической линии и образуют три клады, одна из которых с высокой бутстреп поддержкой, что позволяет предположить расселение европейского хариуса на территории Европейского Севера, по крайней мере, из двух рефугиумов [32].

Особое внимание контрольный регион мтДНК привлекает к себе в силу большой гипервариабельности нуклеотидных последовательностей, что позволяет использовать этот локус мтДНК в эволюционных и филогенетических исследованиях. В работе по изучению микроэволюционных процессов у угольной рыбы *Anoplopoma fimbria* на основании данных о полиморфизме, секвенирования контрольного региона мтДНК результаты показали не только высочайшую вариабельность данного маркера, но и отсутствие, какой либо закономерности при формировании современной популяционной структуры исследуемого вида. Полученные результаты позволили авторам утверждать, что угольная рыба на всем ее пространном ареале представляет собой единую популяцию [29].

Основное отличие митохондриальной ДНК от ядерной ДНК заключается в том, что она не рекомбинирует. Это означает, что накопление мутаций в мтДНК идёт последовательно, причём в 5-10 раз быстрее, чем в ядерном геноме. Всё это даёт возможность, как констатировать наличие генетического разнообразия, так и реконструировать историю расселения видов. Однако методы на основе мтДНК не всегда применимы, например, для определения видовой принадлежности североатлантических видов морских окуней рода *Sebastes*, так как мтДНК этих видов имеет низкий уровень генетического разнообразия [35].

Также ограничено применение митохондриальной ДНК в изучении динамики внутривидовых генетических процессов, исследовании механизмов адаптивной радиации экологических форм в незначительных временных масштабах, измеряемых жизнью нескольких поколений. Широкое применение в связи с этим приобрели микросателлиты, которые как маркеры полиморфизма ядерного генома стали своеобразной альтернативой аллозимам [35].

Установление наличия гибридов возможно с помощью ядерных маркеров генов, позволяющих идентифицировать аллели обоих родителей в генотипе. Маркеры мтДНК, которые наследуются по материнской линии, также могут использоваться, но при определённых условиях (исключая рекомбинацию, горизонтальный перенос и т.д.). Сведения о гибридах, полученные по маркерам мтДНК следует считать предварительными, так как точно генотип гибрида может быть идентифицирован только по ядерному геному [18].

Одними из наиболее распространённых маркеров ядерной ДНК являются микросателлиты. Микросателлиты — участки ядерного генома (локусы), состоящие из повторяющихся последовательностей. Большое число микросателлитных локусов в сочетании с их высокой вариабельностью делает их хорошим инструментом для выявления генетических различий не только между отдельными популяциями, но и группами особей внутри популяции. Также микросателлиты широко применяются в исследованиях внутривидовых и межвидовых демографических процессов, таких как, миграции отдельных особей, дрейф генов и т.д. [8].

В ряде популяционных исследований сиговых (адаптивной радиации, гибридизации между филогенетическими линиями) применяются AFLP-маркеры (Amplified Fragment Length Polymorphism – Полиморфизм длины амплифицированного фрагмента). AFLP являются доминантными диаллельными маркерами. Можно оценивать изменчивость одновременно по многим локусам и выявлять единичные нуклеотидные замены в неизвестных

участках генома, в которых может присутствовать неизвестный функциональный ген, несущий данную мутацию. Эта группа маркеров позволяет выявлять скрытую генетическую изменчивость в популяциях одного вида и близкородственных видах, однако, для исследований надвидовых таксонов эти маркеры не применимы, из-за их высокой изменчивости [8].

Род *Thymallus* вызывает особенные затруднения с точки зрения молекулярной идентификации, так как несколько разных видов могут иметь один и тот же гаплотип баркодингового гена [41].

Поэтому необходимо развитие молекулярно-генетических методов идентификации лососевых рыб, и особенно поиск новых методов идентификации и разграничения симпатрических видов.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Районы работ

С июня 2019 года по июнь 2021 года коллекционерами, представленными в таблице 1, были собраны образцы тканей хариуса из различных участков бассейна реки Енисей.

Таблица 1. Пробы хариуса 2019 – 2020 года

Количество проб	Номера проб	Место пробоотбора	Коллекционер
16	1-16	р. Енисей (70 км ниже от Красноярска)	Долгих П.М.
4	17-20	р. Енисей на участке между Майнским и Красноярским водохранилищами	Некипелова Е.О
20	21-40	Река Казыр	Корнилаева Т.В.
20	41-60	р. Северная (приток реки Нижняя Тунгуска)	Заделёнов В.А.

Всего было собрано 60 проб. Для генетического анализа пробы мышечной ткани, плавники рыб помещали в стеклянные флаконы или полипропиленовые пробирки, фиксировали 96% этанолом, хранили при 4°C.

Коллекционерами были предоставлены карты вылова рыбы, созданные в приложении «Гугл карты» с вручную обозначенными местами вылова. Карта на рисунке 2 предоставлена Долгих П.М. Карта на рисунке 3 предоставлена Корнилаевой Т.В. Карты вылова рыбы с других участков реки Енисей получить не удалось.

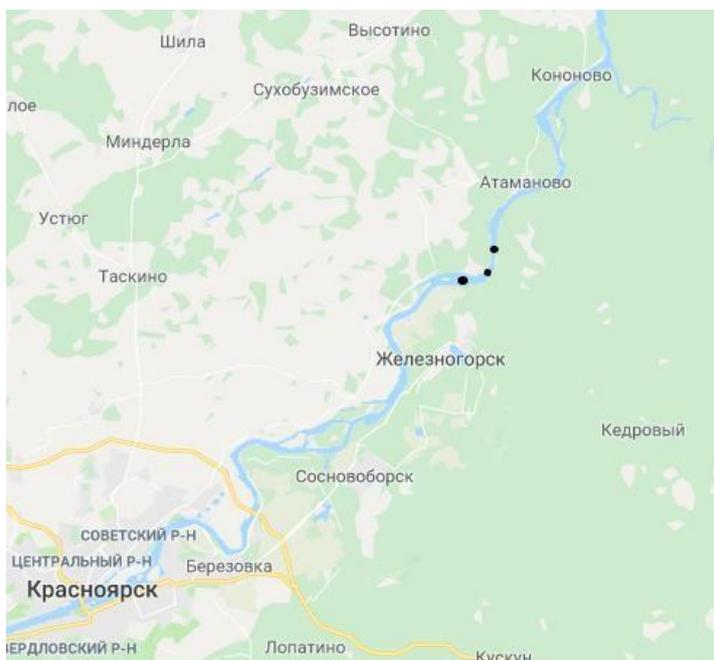


Рисунок 2 – Места вылова проб 1-16, 70 километров ниже Красноярска.



Рисунок 3 – Места вылова проб 21-40, река Казыр, около д. Петропавловка, Курагинский район, Красноярский край.

Летом 2021 года Иваном Владимировичем Зуевым были любезно предоставлены новые пробы хариусов из притоков р. Енисей (табл. 2).

Таблица 2. Пробы хариуса 2021 года

Количество проб	Номера проб	Места пробоотбора
15	100 – 114	река Тамасул
10	115 – 124	река Мана
5	125 – 129	река Берёзовка
1	130	река Гладкая Кача
6	131 – 136	река Крутая Кача
8	137 – 144	река Базаиха

Всего было собрано 45 проб, для генетического анализа данные пробы ткани, плавники отбирали по тому же принципу, что и ранее.

Также была предоставлена карта вылова рыбы с вручную обозначенными местами вылова (рисунок 4).

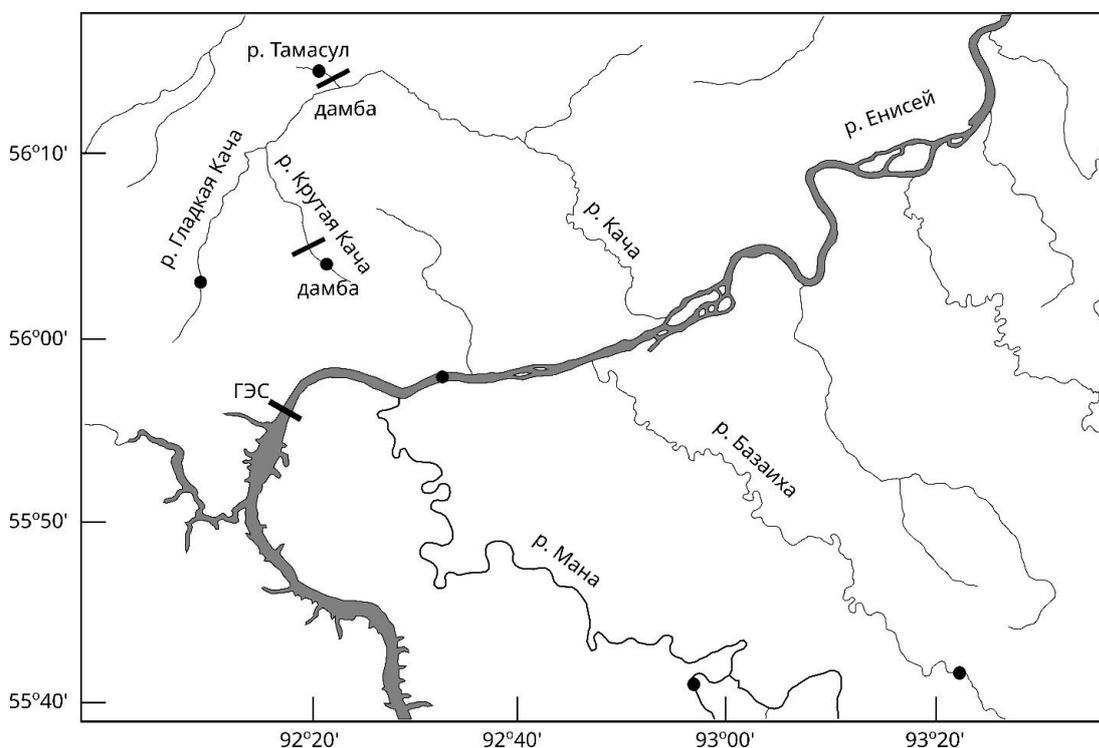


Рисунок 4 – Места вылова проб 100-144 в средней части реки Енисей.

## 2.2. Метод генетического анализа

Метод генетического анализа включает в себя несколько этапов:

### Этап 1. Выделение тотальной ДНК

Солевой метод выделения ДНК [38]: у хариуса была взята мышечная ткань в основании спинного плавника, масса ткани составляла 50-100 мг. К 50-100 мг ткани добавляли 400 мкл лизирующего буфера (0,4 М NaCl, 0,01М Tris - HCl, pH 8,0; 2мМ ЭДТА, pH 8,0; 2% додецилсульфата натрия (SDS) и протеиназу К (до конечной концентрации 0,05 мг/мл). Лизис ткани проводили в течение 1-5 часов при 56 °С в термостатирующем шейкере.

После полного растворения ткани к лизату добавляли 300 мкл 6М NaCl, пробу перемешивали в течение 30 секунд и центрифугировали при 10 000 оборотов в минуту в течение 30 минут. Надосадочную жидкость отбирали в чистые пробирки и приливали двойной объём 96% перегнанного этанола. Помещали пробирки в морозильную камеру и выдерживали при температуре -20°С 1 час, затем центрифугировали при 14000 оборотов в минуту при температуре 4°С. Надосадочную жидкость удаляли, осадки дважды промывали 500 мкл 70% этанола, а затем подсушивали в стерильном ламинарном боксе, не допуская пересушивания. Высушенный осадок ДНК растворяли в 100мкл TE - буфера (10 мМ Трис-HCl, 0.1 мМ ЭДТА, pH 8.0).

В нескольких случаях, когда метод, описанный выше, не позволил получить ДНК приемлемого качества, использовали метод выделения ДНК с помощью цетилтриметиламмония бромида [40]: у хариуса взяли кусочек мышечной ткани в основании спинного плавника, масса ткани составляла 40-50 мг. Тканевые пробы измельчали, помещали в пробирки с 0,5мл лизирующего буфера. Буфер имел pH 8.0 и содержал 1.2% СТАВ (цетилтриметиламмония бромид), 60 мМ Трис-HCl, 10 мМ ЭДТА, 0,8М NaCl; непосредственно перед использованием добавляли дитиотреитол (до конечной концентрации 50 мМ) и протеиназу К (конечная концентрация 0,5мг/мл). Смесь инкубировали в течение одного часа при температуре 65

градусов Цельсия, затем охлаждали до комнатной температуры, добавляли хлороформ (500 мкл), две фазы осторожно перемешивали, переворачивая пробирку руками в течение 30 секунд. Фазы разделяли посредством центрифугирования 15 мин при 12000 об/мин. Верхнюю водную фазу аккуратно отбирали и переносили в пробирки с 200 мкл хлороформа, перемешивали, снова центрифугировали. Верхнюю водную фазу переносили в чистые пробирки, добавляли 2 объема буфера №2 (1% СТАВ, 50мМ Tris-HCl, 10мМ ЭДТА, pH 8,0), перемешивали, а затем центрифугировали, как описано выше. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляли, к осадку, который представлял собой комплекс ДНК и СТАВ, добавляли 400 мкл буфера №3 (1М NaCl, 10мМ Tris-HCl, 1мМ ЭДТА, pH 8,0).

Полученную смесь нагревали в течение 10 минут при температуре 65 градусов Цельсия для растворения комплекса ДНК. После этого добавляли 400 мкл изопропанола, перемешивали, смесь выдерживали в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем центрифугировали, как описано выше. Осадок ДНК дважды промывали 500мкл этанола (70%), а затем подсушивали в стерильном ламинарном боксе, не допуская пересушивания. Высушенный осадок ДНК растворяли в 100мкл ТЕ-буфера (10 мМ Tris-HCl, 0.1 мМ ЭДТА, pH 8.0). Раствор ДНК хранили в холодильнике для кратковременного использования, или помещали в морозильную камеру при температуре -20 градусов Цельсия на более длительные сроки хранения [45].

Концентрацию и чистоту образцов ДНК оценивали по поглощению света длиной волны 260 нм на спектрофотометре NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, США).

Этап 2. Амплификация контрольного региона мтДНК методом ПЦР.

Полноразмерный контрольный регион митохондриальной ДНК был амплифицирован методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, комплиментарными фланкирующим генам тРНК F\_Pro-tRNA 5'-ACCCTTAACTCCCAAAGC, R\_Phe-tRNA 5'-GTGTTATGCTTTAGTTAAGC.

В состав смеси ПЦР (20 мкл) входили: 1,5 ед. активности TaqSE ДНК полимеразы (СибЭнзим, Новосибирск), реакционный буфер (67 mM TrisHCl (pH 8 при 25°C), 16,6 mM сульфат аммония, 0.01% Tween-20), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, по 10 пмоль праймера прямого и обратного, смесь dNTP (0,2 mM каждого), бычий сывороточный альбумин (0,2 mM), ДНК - матрица 2 мкл (200-800 нг).

Для того чтобы избежать контаминации ПЦР, все манипуляции проводили в стерильном ламинарном боксе, обработанном ультрафиолетом, использовали сертифицированные пробирки для ПЦР и наконечники для автоматических пипеток. Для контроля контаминации всегда ставили отрицательную контрольную реакцию, в которую в качестве матрицы добавляли стерильную воду.

Реакция осуществлялась в амплификаторе Biometra TPersonal (Германия). Программа: начальная денатурация (температура 95 градуса, время 2 минуты), затем 28 циклов: денатурация (температура 94 градусов, время 30 секунд), отжиг праймеров (температура 50 градусов, время 30 секунд), элонгация (температура 72, время 1 минута 30 секунд). Заключительная элонгация проводилась при 72 градусах в течение 5 минут.

Этап 3. Электрофорез в агарозном геле.

Размер, количество и чистоту ПЦР-продуктов проверяли электрофорезом в 1.2% агарозном геле. Для электрофореза применяли буфер, ТАЕ, (40 mM Трис-ацетат, pH 8.0, 1 mM ЭДТА). Для определения размера продуктов амплификации в одну из лунок геля наносили 1 мкг маркера 100bp+1,5Kb+3Kb (СибЭнзим, Новосибирск).

Электрофорез проводили 25 минут, при U=100В. После завершения электрофореза результат фотографировали под ультрафиолетовым светом системой гель-документирования «Взгляд» (Хеликон, Москва)..

Этап 4. Секвенирование.

Для секвенирования контрольного региона митохондриальной ДНК применяли метод Сэнгера.

ПЦР-продукты перед постановкой реакции секвенирования очищали от несвязавшихся праймеров и дНТФ с помощью набора Illustra ExoStar PCR and Sequence Reaction Clean-Up Kit (GE healthcare, IL, USA).

С ПЦР-продуктами ставили реакцию секвенирования согласно протоколу с применением меченых праймеров и набора USB® Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Affimetrix, OH, USA). Секвенирование проводили с помощью ДНК-анализатора NEN Model 4300 (Li-Cor, NE, USA).

Последовательности ДНК были отредактированы в программе eSeq, поставляемой с ДНК-анализатором. С помощью онлайн-сервиса BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) в базе данных GenBank были найдены ближайшие соответствия полученным последовательностям контрольного региона мтДНК.

#### Этап 5. Филогенетический анализ.

Чтобы графически представить расхождение между последовательностями, было построено филогенетическое древо с помощью программного обеспечения MEGA версия X [48]. Использовался алгоритм максимального правдоподобия; бутстреп-поддержка рассчитана с 500 повторений. Различия последовательностей были рассчитаны по 2-параметрической модели дистанций Кимура, наиболее подходящей модели нуклеотидных замен, выбранной с помощью Байесовского информационного критерия соответствующей утилиты программы.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 5 представлены результаты электрофореза полученных в ПЦР полноразмерных участков контрольного региона мтДНК образцов хариусов из р. Енисей и р. Казыр. Не удалось добиться необходимого для постановки реакции секвенирования ДНК количества ампликонов в пробах 17 – 20, 22, 23, 26, 28 – 31, 34, 36, 37 и 39. Вероятно, концентрация ДНК, внесенной в реакционную смесь, оказалась недостаточной, либо в пробах ДНК присутствовали ингибиторы ПЦР.

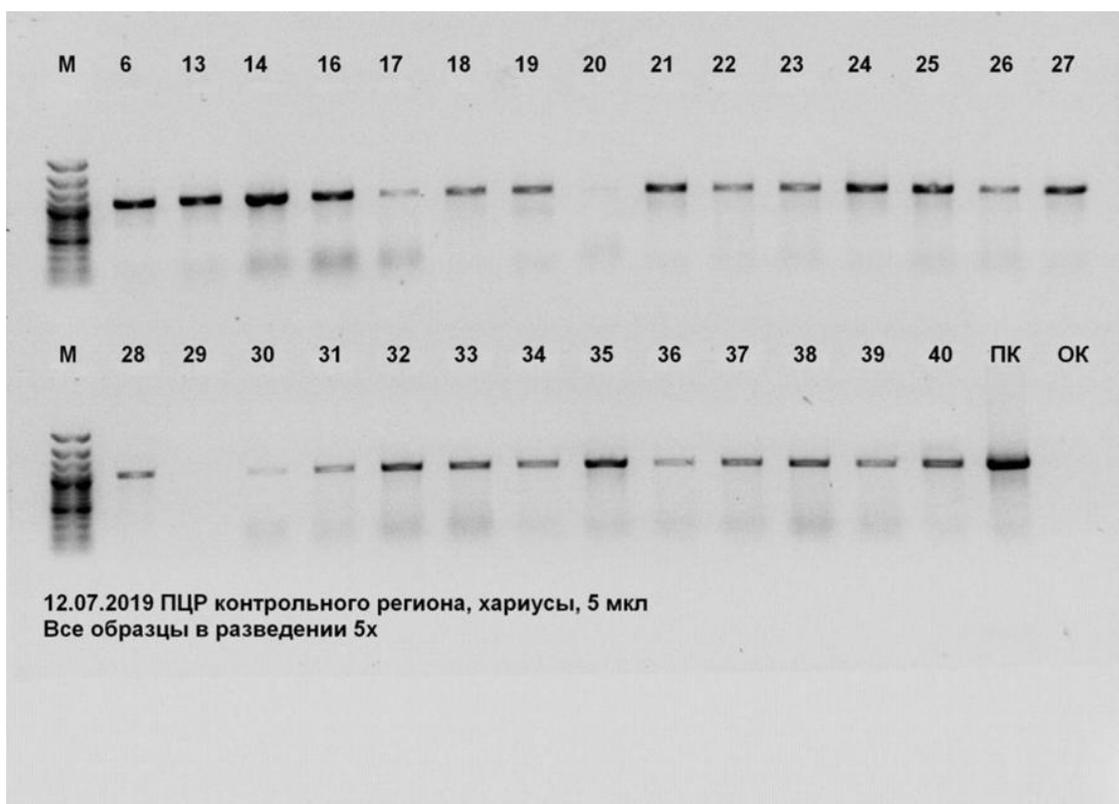


Рисунок 5 – ПЦР контрольного региона, хариус из р. Енисей (6-20), р. Казыр (21-40).

На рисунке 6 представлены результаты электрофореза полученных в ПЦР полноразмерных участков контрольного региона мтДНК образцов хариусов р. Маны и р. Крутой Качи.

**Изъято в связи с авторским правом 6 страниц**

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Традиционный способ идентификации по внешним морфологическим признакам может вести к ошибкам, поскольку хариусовые рыбы отличаются высокой фенотипической пластичностью. С другой стороны, идентификация рыб может быть непростой задачей из-за генетической variability и отсутствия чётких границ между таксонами.

Особое внимание контрольный регион мтДНК привлекает к себе в силу большой гипервариабельности нуклеотидных последовательностей, что позволяет использовать этот локус мтДНК в эволюционных и филогенетических исследованиях. У рыб рода *Thymallus* длина контрольного региона мтДНК составляет 1000-1005 пн [46].

Анализ последовательностей контрольного региона мтДНК, проведенный для нескольких групп образцов, собранных в разных участках бассейна Енисея, показал наличие одной четкой монофилетической группы, к которой относятся образцы, собранные в р. Казыр и гомологичные им референсные последовательности *Thymallus svetovidovi*. В 2020 году авторы [52,53] указали в качестве нижней границы ареала данного вида верхнюю часть Енисея (река Абакан, река Конуй). Результаты нашей работы позволяют предположить, что ареал верхнеенисейского хариуса значительно шире.

Таксономическая принадлежность вида хариуса, обитающего в средней части реки Енисей (от Саяно-Шушенской ГЭС до реки Ангара), носит дискуссионный характер. Предполагалось, что там обитает и сибирский хариус – *Thymallus arcticus* [17]. Однако последние работы указывают на то, что там обитает только байкальский хариус, и наши результаты это подтверждают [52]. Хариусы, выловленные из притоков средней части р. Енисей (р. Тамасул, р. Гладкая Кача, р. Крутая Кача и р. Берёзовка) относятся к виду *Thymallus baicalensis* – байкальский хариус.

При анализе последовательностей контрольного региона в хариусах из нескольких притоков средней части реки Енисей, в частности рек Мана и Базаиха, мы получили неоднозначные данные, ставящие под вопрос гипотезу

о том, что в средней части р. Енисей обитает только байкальский хариус. Некоторые образцы (117, 118, 119, 140, 141) показали высокую степень родства с референсными последовательностями *Thymallus svetovidovi* и хариусами, выловленными в реке Казыр.

19. Thymal_21	T G - T A T T C A C C C A T - - A A G T C T T A T A G C T A T
20. Thymal_24f	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T A A T
21. Thymal_25f	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T
22. Thymal_26	T G - T A T T T A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T
23. Thymal_27f	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T
24. Thymal_35f	T G - T A T T T A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T
25. Thymal_42	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
26. Thymal_43	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
27. Thymal_44	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
39. Thymal_102	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
40. Thymal_103	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
41. Thymal_104	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
42. Thymal_115	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
43. Thymal_116	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T
44. Thymal_117	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T
45. Thymal_118	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T
46. Thymal_119	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T
47. Thymal_125	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
48. Thymal_126	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
49. Thymal_127	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
59. Thymal_138	T G - T A T T T A C C C A T - - A A C T A T A T T A G T T A T
60. Thymal_140	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T C A T A - C A G T T A T
61. Thymal_141	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T C A T A - C A G T T A T
62. EU676294 Thymallus svetovidovi isolate Kon1	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T
63. EU676292 Thymallus svetovidovi isolate Shi06	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T
64. EU676291 Thymallus svetovidovi isolate Shi07	T G - T A T T C A C C C A T - A A G T T A T A - C A G T T A T

Рисунок 10 – Выровненные последовательности хариусов и референсов (MEGA X)

На рисунке 10 отмечены идентичные особенности (замены) в последовательностях, характерные как для хариусов р. Казыр, так и для хариусов р. Мана, р. Базаиха и референсов *Thymallus svetovidovi* – верхнеенисейский хариус. Это может свидетельствовать о том, что ареал верхнеенисейского хариуса значительно шире, чем мы предполагали.

Необходимо провести дополнительные исследования в притоках средней части реки Енисей, для установления более точного ареала как верхнеенисейского, так и байкальского хариуса.

Верхнеенисейский хариус является малоизученным видом, особенности его биологии практически не изучены, как и особенности распространения данного вида.

Традиционно считалось, что в нижнем участке Енисея от устья реки Ангара до Карского моря обитает сибирский хариус. Однако в реках, граничащих с данным участком (Ангара, Нижняя Тунгуска) отмечается байкальский хариус [21]. Это подтверждают полученные нами результаты, что хариусы, выловленные в реке Северная (приток Нижней Тунгуски) относятся к виду *Thymallus baicalensis* – байкальский хариус.

*Thymallus arcticus* – сибирский хариус - не был идентифицирован в наших пробах.

## ВЫВОДЫ

На основании филогенетического анализа последовательностей контрольного региона мтДНК хариусов, выловленных в разных участках бассейна реки Енисей, были сделаны следующие выводы:

1. Хариусы, выловленные в верхней части бассейна Енисея (река Казыр) относятся к виду *Thymallus svetovidovi* – верхнеенисейский хариус.
2. Хариусы, выловленные в нижней части бассейна Енисея (река Северная - приток Нижней Тунгуски) относятся к виду *Thymallus baicalensis* – байкальский хариус.
3. Таксономический статус хариуса в средней части бассейна Енисея носит дискуссионный характер. По полученным нами данным преимущественно там обитает *Thymallus baicalensis* – байкальский хариус, однако в некоторых притоках (р. Мана, р. Базаиха) обнаружен *Thymallus svetovidovi* – верхнеенисейский хариус.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Антонов А. Л. Ихтиофауна верхней части бассейна Р. Буряя / Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2007. – №.3. – С. 49–59.
2. Антонов А. Л., Книжин И. Б. Загадка амурского хариуса / А. Л. Антонов, И. Б. Книжин // Природа. – 2014. – №. 1. – С. 31–37.
3. Баланов А. А., Кухлевский А. Д. Изменчивость окраски *Lycodes uamatoï* Toyoshima, 1985 (Pisces: Zoarcidae) в северной части Японского моря / Биология моря. – 2011. – Т. 37. – №. 6. – С. 447–454.
4. Бачевская Л. Т., Переверзева В. В. Изменчивость гена цитохрома b митохондриальной ДНК в искусственно созданной и донорной популяциях кеты (*Oncorhynchus keta walbaum*) рек Кулькуты и Яма (северное побережье Охотского моря) / Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15. – №. 3. – С. 469–474.
5. Богуцкая Н.Г. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями / Н.Г. Богуцкая, А.М. Насека. – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – 389 с.
6. Богданов Н. А. , Пресноводные рыбы Средней Сибири: монография / Г. И. Богданова, А. Н. Гадинов, В. А. Заделёнов // под общ. ред. Е. Н. Шадрина. – Норильск: АПЕКС, 2016. – 200 с.
7. Боровикова Е. А., Романов В. И., Никулина Ю. С. Морфологические и генетические особенности ряпушки (*Coregonidae: Coregonus* sp.) озера Собачье (плато Путорана) / Экологическая генетика. – 2016. – Т. 14. №.3. – С. 47–54.
8. Боровикова Е. А. Молекулярно-генетические исследования в решении проблем филогении и филогеографии сиговых рыб (*Coregonidae*) / Труды Института биологии внутренних вод РАН. – 2016. – №. 73. – С. 46–62.

9. Боровикова Е. А., Махров А. А. Систематическое положение и происхождение сигов (*Coregonus*, *Coregonidae*, *Osteichthyes*) Европы. Генетический подход / Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 129. – №. 1. – С. 58–66.
10. Вокин А. И., Матвеев Ф.Н., Самусенок В.П., Юрьев А. Л. Видовое разнообразие и распространение хариусовых рыб в водоемах Байкало-Ангарского бассейна // Современные проблемы биологии, экологии и почвоведения: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию высш. биол. образования в Вост. Сибири. Иркутск. – 2019. – С. 36–38.
11. Вокин А. И., Матвеев Ф.Н., Самусенок В.П., Юрьев А. Л., Просекин К. А., Сатдарова Л. Р. Сравнительная характеристика питания черного байкальского хариуса (*Thymallus baicalensis*) в водоемах Амутской котловины в верховьях р. Баргузин / Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2009. – Т. 2. – №. 2. – С. 27–35.
12. Воропаева Е. Н., Максимов В. Н., Малютина С. К., Воевода М. И. Обзор свойств и методов исследования митохондриальной ДНК / *Journal of Siberian Medical Sciences*. – 2016. – №. 3. – С. 36–48.
13. Вышегородцев, А. А. Промысловые рыбы Енисея / А. А. Вышегородцев, В. А. Заделенов. – Красноярск: СФУ. – 2013. – 303 с.
14. Глобальная электронная база данных по видам рыб Fishbase [электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.fishbase.in>
15. Захарченко Г. М. О миграциях хариуса *Thymallus thymallus* в верховьях Печоры // Вопросы ихтиологии. – 1973. – Т. 13. – №. 4. – С. 744–745.
16. Зиновьева Е.А. Экология и систематика хариуса рыб Евразии: автореферат докторского дисс./ Екатерина Анатольевна Зиновьева. – Пермь: Пермский государственный университет. – 2005. – 76 с.
17. Зуев И.В., Трофимова Е.А., Зотина Т.А. Сезонная изменчивость соотношений длины и веса арктического хариуса (*Thymallus arcticus*) и

- сибирского ельца (*Leuciscus baicalensis*), обитающих в среднем течении реки Енисей, Сибирь, Россия // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. – 2019. – Т. 19. – №. 10. – С. 893–897.
18. Картавцев Ю. Ф., Редин А. Д. Оценки генетической интрогрессии, ретикуляции генных деревьев, дивергенции таксонов и состоятельности ДНК-штрихкодирования по молекулярным маркерам генов // *Успехи современной биологии*. – 2019. – Т. 139. – №. 1. – С. 3–24.
19. Книжин И. Б., Богданов Б. Э., Васильева Е. А. Морфобиологическая характеристика сибирского хариуса *Thymallus arcticus* (Thymallidae) высокогорных озёр бассейна верхнего течения реки Ангара // *Вопросы ихтиологии*. – 2006. – Т. 46. – №. 6. – С. 747–760.
20. Книжин, И. Б. Хариусы (*Thymallus* Cuvier, 1829) Голарктики: систематика, филогеография, особенности экологии: автореф. дисс. док - ра биол. наук. / Книжин Игорь Борисович. – Москва, 2009. – 52 с.
21. Книжин, И. Б. К вопросу о разнообразии и таксономическом статусе хариусов (*Thymallus*, Thymallidae) реки Лена / И. Б. Книжин, А. Ф. Кириллов, С. Дж. Вайс // *Вопросы ихтиологии* – 2006. – Т. 46. – №. 2. – С. 182–194.
22. Книжин И. Б., Вайс С. Д., Антонов А. Л., Фруф Э. Морфологическое и генетическое разнообразие амурских хариусов (*Thymallus*, Thymallidae) // *Вопросы ихтиологии*. – 2004. – Т. 44. – №. 1. – С. 59–76.
23. Книжин И.Б. Вайс С. Д. Новый вид хариуса *Thymallus svetovidovi* sp. (Thymallidae) из бассейна Енисея и его положение в роде *Thymallus* / *Вопросы ихтиологии* – 2009. – Т.49. – №. 1. – С. 5–14.
24. Книжин И. Б. Разнообразие и таксономическая идентификация хариусов (*thymallus*) бассейна реки Енисей / *Журнал СФУ*. – 2011. – С. 293–300.

25. Книжин И. Б., Вайс С. Д., Фруф Э. Филогенетический анализ рода *Thymallus* основанный на генах контроль области мтДНК и АТФазы 6, с выводами об ограничениях контрольной области и широкомасштабной Евразийской филогеографии / – Молекулярная филогенетика и эволюция. – 2005. – С.106–117.
26. Колесов Н. А. Биология сибирского хариуса *Thymallus arcticus* бассейна реки Томь // Вестник Кемеровского государственного университета. Серия: Биологические, технические науки и науки о Земле. – 2018. – №. 1. – С. 27–31.
27. Макоедов А.Н. Родственные отношения хариусов Сибири и Дальнего Востока / Москва: Просвещение. – 1999. – 108 с.
28. Некрасов И. С., Селюков А. Г. Репродукционный потенциал озерной формы монгольского хариуса *Thymallus brevirostris* (Kessler, 1879) // Вестник Тюменского государственного университета. – 2016. – Т. 2. – С. 57–67.
29. Орлова С. Ю., Орлова А. М., Волкова А.А., Новикова Р. Н. Микроэволюционные процессы у угольной рыбы *Anoploroma fimbria* на основании данных о полиморфизме двух участков митохондриальной ДНК // Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российская академия наук». – 2014. – Т. 458. – №. 3. – С. 354–354.
30. Позвоночные животные России [электронный ресурс]. – Режим доступа: [www.sevin.ru](http://www.sevin.ru).
31. Пономарев В. И., Захаров А. Б. Распространение и биологические особенности хариуса *Thymallus thymallus* (Thymallidae) на Европейском Северо – Востоке России // Вопросы ихтиологии. – 2021. – Т. 61. – №. 2. – С. 153–166.
32. Пономарева Е. В., Пономарева М. В., Шубина Е. А. Разнообразие гаплотипов контрольного региона мтДНК европейского хариуса (*Thymallus thymallus* L.) рек бассейна Белого моря //Международный

- журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – №. 85.  
– С. 747–751.
33. Попов П.А. Рыбы Сибири: распространение, экология, вылов / Новосибирск: НГУ. – 2007. – 525 с.
34. Решетников Ю.С. (Ред.) Атлас пресноводных рыб России / М.: Наука. – 2003. – Т.2. – 253 с.
35. Рольский А. Ю. Особенности дифференциации морских окуней рода *Sebastes* Атлантического и Северного Ледовитого океанов: автореферат дисс. канд. биол. наук / Алексей Юрьевич Рольский. – Москва, 2016. – 26с.
36. Семенченко А. А., Атопкин Д. М. Сравнительный анализ дальневосточных видов хариусов *Thymallus tugarinae* и *Thymallus grubii* по данным секвенирования гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК // Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). – 2012. – Т. 168. – С. 59–68.
37. Чупров, С. М. Атлас бесчелюстных и рыб водоемов и водотоков Красноярского края / С. М. Чупров. – Красноярск. – 2015. – 144 с.
38. Aljanabi S.M. and Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques / *Nucleic Acids Research*. – 1997. – V. 25. – №. 22. – P. 4692–4693.
39. Bernatchez L. Ecological theory of adaptive radiation. In the book .: Hendry A. P., Stearns SC, editorial. *Evolution illuminated: salmon and their relatives* / New York: Oxford University press. – 2004. – №. 10. – P.175–207.
40. Crespi B.J., Teo R. Comparative phylogenetic analysis of the evolution of semelparity and life history in salmonid fishes // *Evolution*. 2002. – V. 56. – №.5. – P. 1008–1020.
41. Hutchings J.A., Morris D.W. The influence of phylogeny, size and behaviour on patterns of covariation in salmonid life histories // *Oikos*. – 1985. – P. 118–124.

42. Crête-Lafrenière A., Weir L.K., Bernatchez L. Framing the Salmonidae family phylogenetic portrait: a more complete picture from increased taxon sampling // *PloS one*. – 2012. – V. 7. – №. 10. P. e46662
43. Phillips R. B., RAB R Chromosome evolution in salmon (fish): update / *Biol Rev*. – 2001. – V. 7. – №. 1. – P.1–25.
44. Phillips M. J. Delsuc F., Penny, D. Phylogeny at the scale of the genome and the identification of systematic errors/ *Molecular Biology Evolution*. – 2004. – №. 21. – P. 1455–1458.
45. Rehbein H. Identification of the fish species of raw or cold-smoked salmon and salmon caviar by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis/ *Eur. Food Res. Technol.*. – 2005. – V. 220. – P. 625–632.
46. Romanov V.I. On the taxonomic composition of the graylings (Thymallidae) from the Ob and Yenisei River Basins // *International Journal of Environmental Studies*. – 2017. – V. 74. – №. 5. – P. 845–853.
47. Satoh T.P., Miya M., Mabuchi K., Nishida M. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes // *BMC Genomics*. – 2016. – V.17. – №.1. – P. 719–739.
48. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2013. – V. 30. – P. 2725–2729.
49. Taylor E. B. Evolution in mixed company: evolutionary inferences from studies of natural hybridization in Salmonidae // *Evolution illuminated: Salmon and their relatives*. – 2004. – P. 23–263.
50. Weiss S. J. et al. Global systematic diversity, range distributions, conservation and taxonomic assessments of graylings (Teleostei: Salmonidae; *Thymallus* spp.) // *Organisms Diversity & Evolution*. – 2021. – V. 21. – №. 1. – P. 25–42.
51. Weiss S. et al. Complex patterns of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of

- the mitochondrial DNA control region // *Molecular Ecology*. – 2002. – Vol. 11. – №. 8. – P.: 139–1407
52. Weiss S. et al. Comparative genetic analysis of grayling (*Thymallus* spp. Salmonidae) across the paleohydrologically dynamic river drainages of the Altai – Sayan mountain region // *Hydrobiologia*. – 2020. – V. 847. – №. 13. – P. 2823–2844.
53. Weiss S. et al. Multiple species of grayling (*Thymallus* sp.) found in sympatry in a remote tributary of the Amur River // *Zoologica Scripta*. – 2020. – V. 49. – №. 1. – P.117–128.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
институт

Кафедра геномики и биоинформатики  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
  
подпись      инициалы, фамилия  
« 23 » июня 20 23 г

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

06.03.01 – «Биология»

06.04.01.06 – «Геномика и биоинформатика»

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ХАРИУСОВ (THYMALLUS)  
БАССЕЙНА РЕКИ ЕНИСЕЙ  
тема

Руководитель

  
подпись, дата

с.н.с. к.б.н.  
должность, ученая степень

М. Ю. Трусова  
инициалы, фамилия

Выпускник

  
подпись, дата

К.Е. Заболотная  
инициалы, фамилия

Рецензент

  
подпись, дата

к. б. н. доцент

И.В. Зуев  
инициалы, фамилия

Красноярск, 2023