

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ РЫБ ОЗЕРА ХАНКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ

© 2019 г. С. В. Туранов^{1,2,*}, Ю. Ф. Картавец^{1,3}, М. Е. Шаповалов⁴

¹Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Национальный научный центр морской биологии
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690041 Россия

²Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
кафедра водных биоресурсов и аквакультуры, Владивосток, 690087 Россия

³Дальневосточный федеральный университет, кафедра биоразнообразия и морских биоресурсов,
Владивосток, 690059 Россия

⁴ФГБНУ ТИНРО-Центр, Владивосток, 690091 Россия

*e-mail: sturcoal@mail.ru

Поступила в редакцию 21.05.2018 г.

После доработки 18.09.2018 г.

Принята к публикации 09.10.2018 г.

Озеро Ханка – крупнейший водоем северо-восточной Азии, являющийся важной частью ресурсов пресноводного рыболовства. Ввиду геологической молодости, а также сообщения с крупными речными системами рек Амур и Уссури Ханка имеет низкую степень эндемизма. Список рыб озера постоянно пополняется за счет инвазий, происходящих как непреднамеренно, так и вследствие интродукции гидробионтов для максимального использования потенциала естественной продуктивности. В связи с этим озеро Ханка является подходящим полигоном для разработки и внедрения системных методов мониторинга видового разнообразия. В настоящей работе впервые представлены результаты комплексного подхода к решению данной задачи. Произведен отлов 64 экземпляров рыб от 16 видов, представляющих четыре семейства. Проанализированы таксономические отношения и дана оценка видового разнообразия с использованием как классических подходов, так и методов ДНК-штрихкодирования. Образцы генотипированы по митохондриальному гену *Co-1*. Сформирована и проанализирована библиотека ДНК-штрихкодов. Средние значения внутривидовых генетических расстояний, скорректированных по модели K2P, составили $0.15 \pm 0.01\%$, расстояния между разными видами в пределах одного рода – $4.08 \pm 0.01\%$. Филогенетический анализ выявил монофилетическое происхождение каждой видовой группы с высокой поддержкой узлов (98–100%). Таким образом, продемонстрирован консенсус морфологических и молекулярно-генетических подходов при разграничении видов и подтверждена высокая эффективность ДНК-штрихкодирования применительно к документации видового разнообразия рыб в оз. Ханка. Новые молекулярно-генетические данные в основном подтверждают описанные ранее таксономические взаимоотношения для проанализированных рыб, однако требуются дополнительные исследования для уточнения видового состава р. *Acheilognathus* в оз. Ханка.

Ключевые слова: видовое разнообразие рыб, Ханка, ДНК-штрихкодирование, *Co-1*.

DOI: 10.1134/S0016675819040155

Около половины известного на сегодняшний день видового разнообразия рыб сформировано пресноводными таксонами, которые, являясь значимой частью таксономического богатства позвоночных животных [1], сосредоточены на территории менее 1% от площади земной поверхности [2, 3]. Пресноводные системы, характеризующиеся уникальностью механизмов формирования и поддержания современного биоразнообразия [4], в настоящее время находятся в условиях жесткой антропогенной нагрузки, заключающейся в быстром

изменении ландшафта, гидрологического режима водоемов, климата, превышении допустимых объемов вылова, загрязнении водоемов и распространении инвазивных видов [5]. В первую очередь это относится к системам, представляющим наибольшую рыбохозяйственную ценность, таким как крупные реки и озера.

Ограниченная способность к перемещению в ответ на климатические и ландшафтные изменения ввиду особенностей местообитания делает пресноводных рыб группой, наиболее подвер-

женной риску внезапного вымирания [6, 7]. Это привлекает внимание к пресноводным рыбам в качестве популярного объекта для разработки и применения комплекса классических и современных методов изучения видového разнообразия [4, 8–10]. Мониторинг таксономического и генетического разнообразия пресноводных рыб в последнее время развивается как в качестве национальных и региональных программ [11–18], так и в виде узконаправленных проектов [19–25]. Данное направление с недавнего времени развивается и в России. К изучению привлекаются морские [26, 27] и пресноводные [16, 28, 29] рыбы, включая анализ подмены рыбных продуктов в торговой сети [30]. Отмечается успешное применение методов ДНК-штрихкодирования при идентификации рыб и изучении видového разнообразия. В то же время обращается внимание на необходимость оптимизации порога разграничения внутри- и межвидовой изменчивости [16], а также ограниченность метода в таксономических и особенно в молекулярно-филогенетических приложениях ввиду малой филогенетической информативности штрихкода *Co-1* [16, 27].

ДНК-штрихкодирование [31, 32] – направление, деятельность которого сконцентрирована на инвентаризации видového разнообразия живых организмов с использованием унифицированных молекулярно-генетических методов [33] и средств биоинформатики [34, 35]. Для изучения видového разнообразия рыб в настоящее время успешно используются последовательности митохондриального гена *Co-1* [33, 36–38]. Несмотря на имеющиеся недостатки, свойственные методам молекулярной систематики в целом [39, 40], ДНК-штрихкодирование зарекомендовало себя в качестве эффективной таксономической утилиты применительно к абсолютному большинству известных видов рыб [37–39] и находит широкое применение во многих смежных областях мониторинга биологического разнообразия [41–43].

Крупнейшим пресноводным водоемом на территории северо-восточной части Азии является оз. Ханка, располагающееся на границе между Китаем и Россией и принадлежащее водосборному бассейну р. Амур. Рыбы озера формируют динамическое сообщество [44], насчитывающее более 86 видов, относящихся к 60 родам и 18 семействам [45–50]. К особенностям ихтиофауны оз. Ханка можно отнести очень низкую степень эндемизма ввиду открытости и геологической молодости водоема [44], а также нарастающее из года в год по разным причинам число инвазивных видов [48], что требует внедрения комплексных методов мониторинга видového разнообразия. Целью настоящей работы является сборка и анализ библиотеки ДНК-штрихкодов, а также исследование таксономического разнообразия рыб оз. Ханка на ос-

нове последовательностей митохондриального гена *Co-1*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал настоящей работы составили последовательности 5'-участка митохондриального гена *Co-1* от 64 экземпляров рыб, принадлежащих 16 видам, 12 родам и четырем семействам. Внутривидовая выборка при этом насчитывала от 1 до 7 экземпляров. Рыбы были пойманы в 2012 г. в двух точках акватории оз. Ханка. Идентификация видовой принадлежности рыб была выполнена с использованием консенсусных данных о диагностических признаках [46, 47, 49–52] при учете номенклатурных поправок [53] (электронное приложение, табл. 1, 3). Для подготовки к формированию библиотеки ДНК-штрихкодов от каждого экземпляра индивидуально был взят кусочек ткани скелетной мускулатуры (100–300 мг) с последующей фиксацией в 95%-ном этиловом спирте. Каждый экземпляр был сфотографирован, подготовлен к ваучеризации (документированию) и передан в хранилище музея ННЦМБ ДВО РАН. Тотальная ДНК из зафиксированной в этаноле мышечной ткани была выделена хлороформ-фенольным методом с исключением фенола на стадии депротенинизации и добавлением при этом РНКазы [54]. Участок гена *Co-1* от каждого образца был амплифицирован посредством ПЦР с использованием праймеров F1-5'-TCAACCAACCA-CAAAGACATTGGCAG-3' и R1-5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' [55]. Реакционная смесь ПЦР объемом 25 мкл включала 1 мкл раствора ДНК (20–150 нг), 5 мкл 5× *Taq*-Reg-буфера (Евроген, конечная концентрация $MgCl_2$ – 2.5 мМ), dNTPs (Евроген, 200 мкМ каждого фосфата), по 0.4 мМ прямого и обратного праймеров, а также 0.05 ед. *Taq*-полимеразы (Евроген). Термический алгоритм состоял из предварительного нагрева при 94°C в течение 2 мин, 35 циклов по следующей схеме: денатурация при 94°C в течение 40 с, отжиг при 52°C в течение 40 с и 1 мин элонгация при 72°C с заключительной стадией в течение 10 мин. Проверку результатов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующей экспозицией в растворе бромистого этидия и просмотром под ультрафиолетовым светом с использованием системы визуализации (Хеликон). Успешно амплифицированные фрагменты были секвенированы с ПЦР-праймерами и набором BrightDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (NimaGen). Капиллярный электрофорез полученных фрагментов проведен на секвенаторе ABI Prism 3130 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems) в ННЦМБ ДВО РАН. Сборку консенсусных последовательностей из полученных хроматограмм осуществляли в программе ChromasPro 1.34 (ChromasPro; <http://www.technelysium.com.au/>

chromas.html/). Выравнивание последовательностей и корректировка рамки считывания были проведены в MEGA 6.0 [56] с использованием алгоритма MUSCLE [57]. При выполнении данной процедуры в качестве референсных последовательностей использовались наиболее близкие по значению сходства из выводных данных BLAST [58] в GenBank [59]. Последовательности вместе со всей необходимой информацией и фотографиями рыб были размещены в BOLD [34, 35] в проекте с названием FOLK (Fishes of the Lake Khanka). При расчете генетических расстояний применяли коррекцию по двухпараметрической модели Кимуры [60]. Для разграничения видов рыб, а также возможности обсуждения таксономических отношений надвидового ранга были построены филогенетические деревья с использованием следующих подходов: NJ (ближайшего соседа) и ML (максимального правдоподобия), представленных в программном пакете MEGA. Дополнительно использовали поиск оптимальной топологии с помощью байесовского метода (BI) в программе MrBayes 3.2 [61]. Модель нуклеотидных замещений была выбрана с помощью средств MEGA при использовании информационного критерия Акаике. Оценка устойчивости топологии проведена на основе 1000 реплик непараметрического бутстреп-теста (NJ, ML), а также значений апостериорной вероятности узлов ветвления (BI). При визуализации филогенетических отношений за основу взята топология ML-дерева (рис. 1). Для разрешения вопроса о таксономической принадлежности и видовом статусе филогрупп в пределах рода *Acheilognathus* Bleeker, 1860 понадобилось привлечение последовательностей добавочного митохондриального маркера, *Cyt-b*. Данный пункт в анализе обусловлен тем, что, несмотря на рекомендации по унифицированию методик ДНК-штрихкодирования рыб [36, 62], молекулярная систематика карпообразных развивалась независимо, с применением в качестве основного маркера *Cyt-b*, и, как следствие, сравнительный материал доступен только для этого фрагмента [63]. Из процитированной работы привлечено 16 последовательностей *Cyt-b* от девяти филогрупп горчаков видового уровня. Филогенетический анализ (рис. 2) выполнен по упрощенной схеме, с исключением методов NJ и BI, в остальном полностью повторяя схему, описанную выше. Совокупный набор данных *Cyt-b* составил 20 последовательностей длиной 1055 пн.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Длина матрицы последовательностей *Co-1* после выравнивания и корректировки рамки считывания равнялась 567 пн. Среднее значение внутривидовых генетических расстояний составило $0.15 \pm 0.01\%$, тогда как между разными вида-

ми в пределах одного рода — $4.08^1 \pm 0.01\%$ (электронное приложение, табл. 2). Несмотря на то, что мы не располагаем достаточной выборкой на уровне родов (более чем одним видом в выборке представлены только роды *Tachysurus* Lacépède, 1803, *Acheilognathus* и *Chanodichthys* Bleeker, 1859), исходя из имеющихся данных можно заключить, что все видовые ветви на филогенетическом дереве располагаются в монофилетических кластерах с поддержкой от 98 до 100%, в то время как разные виды показывают четкое топологическое разобщение (рис. 1). Исключение составляет кластер с горчаками (*Acheilognathus*), где филогруппа sp1 имеет поддержку 88%, причем четкая кластеризация с базальным выделением sp2 достигнута только в топологии NJ, тогда как в деревьях ML и BI (топологии не приводятся) отношения реализованы в виде политомии. Необходимо отметить, что межвидовые генетические расстояния у горчаков являются наименьшими в рассматриваемом наборе данных (2.1%). Так, расстояния между видами внутри рода *Chanodichthys* варьируют от 3.1 до 3.9%, в роде *Hemiculter* Bleeker, 1860 составляют 6.8%, а в пределах *Tachysurus* — 21.1%. По итогам анализа фрагмента *Cyt-b* с высокой поддержкой (97–98%) выделяются два макрокластера, первый из которых сформирован двумя филогруппами видового уровня с взаимной дивергенцией 2.6% и внутривидовыми расстояниями от 0 до 0.6% (рис. 2). Оригинальные последовательности, как и в случае с *Co-1* (рис. 1), разделяются по принадлежности к двум филогруппам. При этом кластер с AC12-6, показывая дивергенцию по отношению к остальным горчакам оригинальной выборки, объединяется с последовательностями *A. asmusii* из оз. Ханка и *A. macropterus* из оз. Казуминаура, являющимися в данном случае парафилетическим. Второй устойчивый макрокластер сформирован пятью филогруппами с взаимной дивергенцией от 5.4 до 13.6%. В него среди прочих входит *A. chankaensis*, пойманный в провинции Анхой. Остальные последовательности не формируют устойчивых узлов, обнаруживая глубокую взаимную дивергенцию от 11 до 25.6%.

ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке видового разнообразия как пресноводных, так и морских рыб стандартизированный фрагмент митохондриального гена *Co-1* является наиболее часто применяемым штрихкодом, проявляя свойства, необходимые для разграничения видовых линий [12–32]. Результаты нашей работы вносят вклад в формирование глобальной референсной базы ДНК-штрихкодов пресноводных рыб, представляя собой первую попытку применения молекулярно-генетических методов

¹ Без включения данных рода *Acheilognathus*.

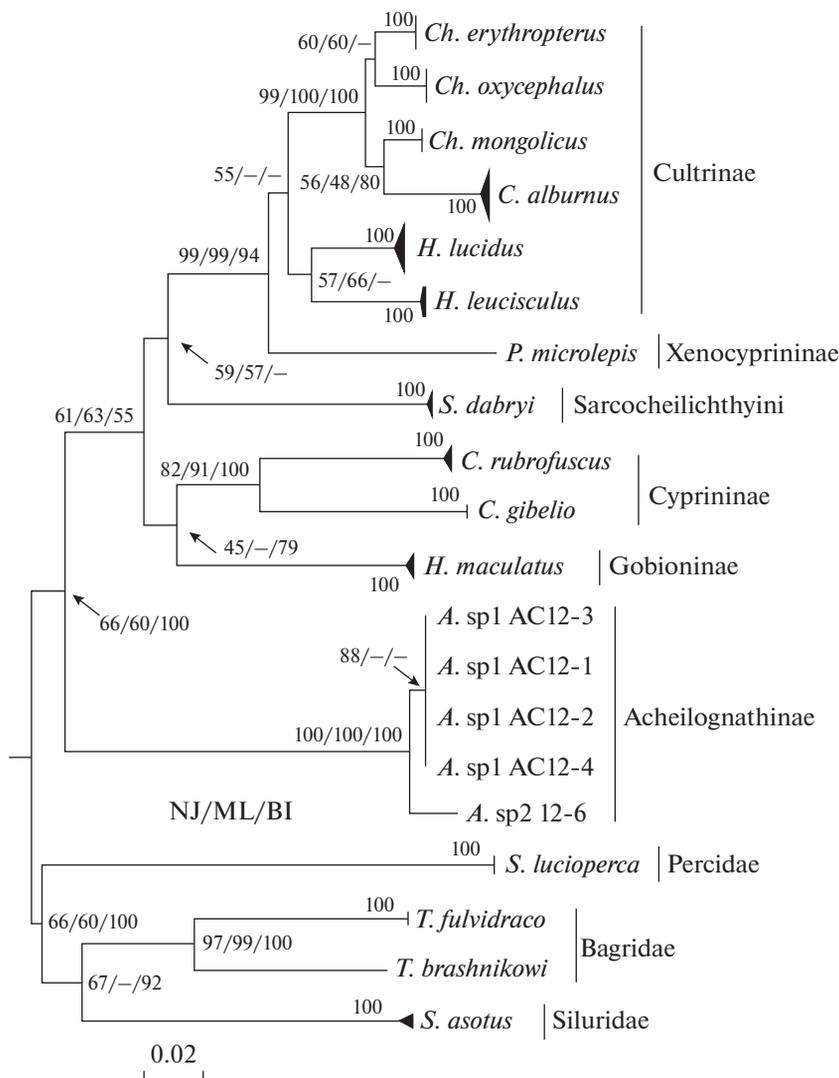


Рис. 1. Филогенетическое дерево, сконструированное на основе последовательностей гена *Co-1* рыб из оз. Ханка. Цифры в узлах ветвления показывают оценки устойчивости топологии. Укоренение проведено по средней точке. Для узлов, оценки устойчивости которых во всех алгоритмах построения совпадали, приведено единственное значение. Все видовые ветви, за исключением *Acheilognathus*, коллапсированы.

для мониторинга видового разнообразия данного водоема, также демонстрируя возможность применения *Co-1* для обсуждения вопросов таксономии рыб оз. Ханка надвидового уровня. Это проявляется в четкой топологической дифференцированности видовых линий на основе дистанционных методов (рис. 1). Результаты соотношения внутри- и межвидовых генетических расстояний сопоставимы с данными по изучению видового разнообразия пресноводных рыб Северной Америки [14] и Европы [15]. Консенсус топологических (рис. 1) и дистанционных (электронное приложение, табл. 2) критериев разграничения видовых линий позволяет подробно обсудить вопросы таксономии рыб оз. Ханка в свете новых молекулярно-генетических данных. Ввиду известных ограниче-

ний филогенетической информативности маркера *Co-1* следует учитывать, что таксономические обоснования в настоящей работе делаются с допущениями, напрямую зависящими от устойчивости узлов филогении.

Cypriniformes: Cyprinidae

Для разработки вопросов систематики и филогении Cyprinidae в течение последних 100 лет используются не только традиционные для карповых признаки внешней морфологии и число рядов глоточных зубов, но также остеологические и эмбриологические особенности, данные кариологического анализа и современные методы биохимических и генетических исследований. Однако несмотря на то, что литература, посвященная

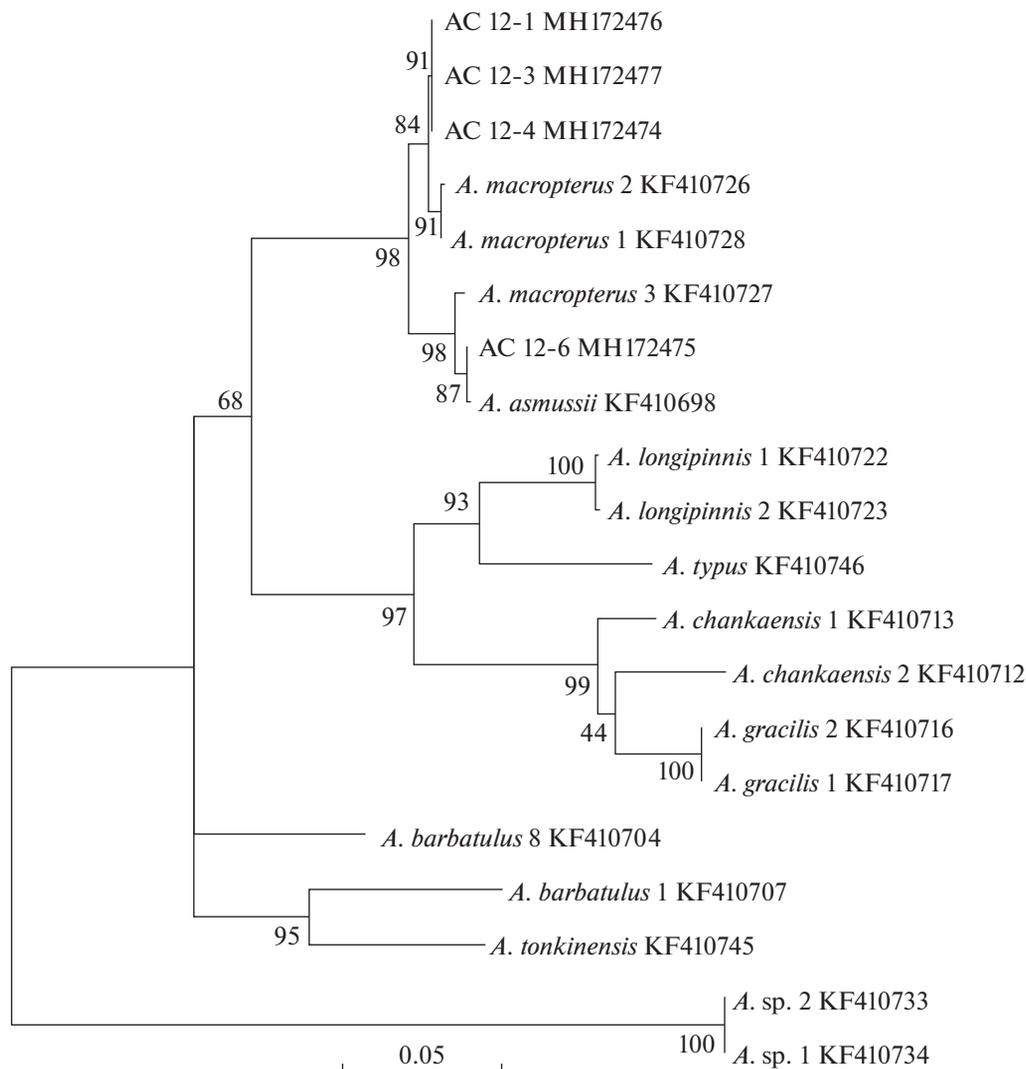


Рис. 2. Филогенетическое ML-дерево, сконструированное на основе последовательностей гена *Cyt-b* рыб рода *Acheilognathus*. Цифры в узлах ветвления показывают оценки устойчивости топологии. Укоренение проведено по средней точке.

вопросам систематики и филогении Cyprinidae, весьма обширна, единой, общепринятой и достаточно аргументированной точки зрения на число и объем его подсемейств нет [47, 64]. Так, в частности, долгое время общепринятым являлось разделение карповых на две ветви – Leuciscinae sensu lato (“безусые карповые”) и Cyprininae sensu lato (“усатые карповые”) [52, 65]. Согласно современным представлениям, усы неоднократно независимо возникали в разных группах, не относимых к настоящим Cyprininae. В соответствии с последними данными [66] подсемейство Gobionidae выделено в отдельное семейство, к которому относится род *Hemibarbus*. На представленной схеме (рис. 1) видно, что основная часть из исследованных карповых разделяется на собственно карповых – амурский сазан *Cyprinus rubrofasciatus* LaCepede, 1803 и серебряный карась *Carassius*

gibelio (Bloch, 1782), от которых отделяется конь пятнистый *Hemibarbus maculatus* Bleeker, 1871, и виды подсемейства Cultrinae, от которых отделяются Sarcocheilichthyini и Xenocyprininae.

Обособленной ветвью, отделившейся от представленных на схеме Cyprinidae ранее всех, располагаются виды подсемейства Acheilognathinae – горчаки. Здесь представлены колючий горчак *Acheilognathus* sp. 1, близкий к *A. asmussii* (Dybowski, 1872), и *Acheilognathus* sp. 2, рассматривающийся как вид-двойник ханкайского колючего горчака *A. chankaensis* (Dybowski, 1872) [67, 68]. Дополнительные данные анализа фрагмента *Cyt-b* (рис. 2) указывают на принадлежность трех горчаков из нашей выборки к предполагаемому *A. macropterus*, тогда как филогруппа, содержащая *A. chankaensis*, обнаруживает по отношению к последне-

му глубокую дивергенцию. Наряду с явной нехваткой референсных данных для достоверного определения видов рода *Acheilognathus* можно предположить, что в оз. Ханка присутствует также и третий вид этого рода. Для прояснения выявленных противоречий требуется дополнительная работа с формированием надежной референсной библиотеки для горчаков.

В недавнем исследовании филогении горчаков Европы и Азии большой группой авторов на основе молекулярно-генетических методов анализа предложено выделить горчаков в отдельное семейство *Acheilognathidae* в составе надсемейства *Cyprinoidea* [63]. Таким образом, отделение горчаков от остальных *Cyprinidae* в рассматриваемой схеме, по-видимому, является следствием их филогенетической обособленности.

Далее из представленной схемы следует, что ветвь пескарей рода *Saurogobio* Bleeker, 1870 — ящерный пескарь *Saurogobio dabryi* Bleeker, 1871 — является внешней по отношению к усатым и безусым карповым. Согласно принимаемой нами системе [47], *Saurogobio* входят в состав подсемейства *Gobioninae* совместно с пятнистым конем *H. maculatus* Bleeker, 1871. Однако в нашем случае род *Hemibarbus* отделяется от остальных усатых карповых значительно позже. По-видимому, на рассматриваемом дереве отражена генетическая неоднородность этого подсемейства, которое, по мнению ряда авторов [47, 69], может быть разделено на две группы родов в ранге подсемейств или триб: *Sarcocheilichthyini* и *Gobioninae*. Согласно А.М. Naseka [70], проанализировавшему имеющиеся на тот момент данные по филогении и систематике *Gobioninae*, в этом подсемействе выделяются четыре группы: *Sarcocheilichthys* group, *Gobio* group, *Hemibarbus* group, в составе которой находится *H. maculatus* Bleeker, 1871, и *Pseudogobio* group, в которую входит *S. dabryi* Bleeker, 1871. Таким образом, положение родов *Hemibarbus* и *Saurogobio* на данной схеме согласуется с современными представлениями о филогении *Gobioninae*.

Основную группу усатых карповых на рассматриваемом дереве представляют уже упомянутый выше пятнистый конь, а также типичные виды карповых — амурский сазан *C. rubrofusca* LaCepede, 1803 и серебряный карась *C. gibelio* (Bloch, 1782), входящие в состав подсемейства *Cyprininae* — карповые. Вторая ветвь — безусых карповых — среди исследованных видов представлена рыбами, объединяемыми в настоящее время [47, 64] в подсемейство *Cultrinae* (уклееподобные): верхогляд *Ch. erythropterus* (Basilewsky, 1855), *Ch. mongolicus* (Basilewsky, 1855), горбушка *Ch. oxycephalus* (Bleeker, 1871), уклея — *C. alburnus* Basilewsky, 1855, востробрюшка уссурийская *H. lucidus* (Dybowski, 1872) и востробрюшка корейская *H. leucisculus* (Basilewsky, 1855).

Базальное положение по отношению к уклееподобным на схеме занимает мелкочешуйный желтопер *P. microlepis* (Bleeker, 1871), который, согласно принимаемой нами системе [47], совместно с подустом-чернобрюшкой *X. macrolepis* (Bleeker, 1871) входит в состав подсемейства *Xenocyprininae*. Однако, согласно ряду исследований [71, 72], анализ биологии размножения типичных *Cultrinae*, с одной стороны, и в сравнении с выделенными в группу *Xenocyprininae* (Banarescu, 1967) мелкочешуйным желтопером и подустом-чернобрюшкой показал, что по строению ооцитов и особенностям формирования плодовитости последние два вида заметно различаются. Таким образом, по-видимому, только морфологических признаков (в частности, отсутствия киля впереди V), а также особенностей сейсмочувствительной системы недостаточно для выделения из *Cultrinae* мелкочешуйного желтопера и объединение его в одно подсемейство с подустом-чернобрюшкой (выделение которого из уклееподобных, на взгляд авторов, действительно обосновано). Однако отсутствие в анализе подуста-чернобрюшки не позволяет рассмотреть этот вопрос с позиций филогенетического анализа. Проведение подобного исследования, в частности, между подсемействами *Cultrinae*, *Leuciscinae* и *Xenocyprininae*, позволило бы создать более обоснованную систему филогенетических отношений внутри этой ветви карповых (электронное приложение, табл. 3).

Siluriformes: Bagridae, Siluridae

Рыбы отряда сомообразных, рассматриваемые в данной работе, представлены двумя видами косаток-скрипунов — китайской косаткой-скрипуном *T. fulvidraco* (Richardson, 1846) и косаткой Бражникова *T. brashnikowi* (Berg, 1907) семейства *Bagridae*, а также амурским сомом *S. asotus* (Linnaeus, 1758) сем. *Siluridae* [47]. На рассматриваемой схеме мы видим четкое разделение рыб отряда *Siluriformes* на две ветви, соответствующие представленным семействам. Нельзя не отметить значительные генетические расстояния и топологическую разобщенность между видами рода *Tachysurus* — китайской косаткой-скрипуном и косаткой Бражникова.

Perciformes: Percidae

К отряду окунеобразных на представленной схеме относится судак — *S. lucioperca* (Linnaeus, 1758) сем. *Percidae*.

Таким образом, по результатам проведенной работы можно отметить согласованность морфологических и генетических границ выделения видовых линий, что подтверждает высокую эффективность ДНК-штрихкодирования применительно к документации видового разнообра-

зия рыб в оз. Ханка. Новые молекулярно-филогенетические реконструкции, представленные в данной работе, в значительной степени согласуются с описанными ранее таксономическими взаимоотношениями для проанализированных рыб.

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РФФИ (проект 15-29-02456) и программы Дальний Восток (проект 18-4-040).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reid G.M., Contreras Macbeath T., Csatadi K. Global challenges in freshwater-fish conservation related to public aquariums and the aquarium industry // *Int. Zoo Yearb.* 2013. V. 47. № 1. P. 6–45. doi 10.1111/izy.12020
2. Ormerod S.J. Current issues with fish and fisheries: editor's overview and introduction // *J. Appl. Ecol.* 2003. V. 40. № 2. P. 204–213. doi 10.1046/j.1365-2664.2003.00824.x
3. Nelson J.S. *Fishes of the World.* Hoboken: John Wiley and Sons, 2006. 601 p.
4. Olden J.D., Kennard M.J., Leprieur F. et al. Conservation biogeography of freshwater fishes: Recent progress and future challenges // *Divers. Distrib.* 2010. V. 16. № 3. P. 496–513. doi 10.1111/j.1472-4642.2010.00655.x
5. Dudgeon D., Arthington A.H., Gessner M.O. et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges // *Biol. Rev.* 2006. V. 81. № 2. P. 163. doi 10.1017/S1464793105006950
6. Ricciardi A., Rasmussen J.B. Extinction rates of North American freshwater fauna // *Conserv. Biol.* 1999. V. 13. № 5. P. 1220–1222.
7. Vié J.-C., Hilton-Taylor C., Stuart S.N. *Wildlife in a changing world: an analysis of the 2008 IUCN Red List of threatened species.* IUCN, 2009.
8. Bruton M.N. Have fishes had their chips? The dilemma of threatened fishes // *Environ. Biol. Fishes.* 1995. V. 43. № 1. P. 1–27. doi 10.1007/BF00001812
9. Harrison I.J., Stiassny M.L.J. *The quiet crisis // Extinctions in near time.* N.Y.: Springer Sci. and Business Med., 1999. P. 271–331.
10. Reynolds J.D., Webb T.J., Hawkins L.A. Life history and ecological correlates of extinction risk in European freshwater fishes // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2005. V. 62. № 4. P. 854–862. doi 10.1139/f05-066
11. Chen W., Ma X., Shen Y. et al. The fish diversity in the upper reaches of the Salween River, Nujiang River, revealed by DNA barcoding // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 17437. doi 10.1038/srep17437
12. Dahruddin H., Hadiaty R.K., Hubert N. DNA Barcoding: foundations and applications for southeast Asian freshwater fishes // *Treubia.* 2017. V. 43. P. 1–16. doi 10.14203/treubia.v43i0.2968
13. Geiger M.F., Herder F., Monaghan M.T. et al. Spatial heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes // *Mol. Ecol. Res.* 2014. V. 14. № 6. P. 1210–1221. doi 10.1111/1755-0998.12257
14. Hubert N., Hanner R., Holm E. et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 6. doi 10.1371/journal.pone.0002490
15. Kneibelsberger T., Dunz A.R., Neumann D., Geiger M.F. Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding // *Mol. Ecol. Res.* 2015. V. 15. № 3. P. 562–572. doi 10.1111/1755-0998.12322
16. Levin B.A., Simonov E., Matveyev M.P. et al. DNA barcoding of the fishes of the genus *Alburnoides* (Actinopterygii, Cyprinidae) from Caucasus // *Mitochondrial DNA. Pt A.* 2018. V. 29. № 1. P. 49–55. doi 10.1080/24701394.2016.1238900a
17. Mustafa K., Yerli S.V., Mangit F. et al. Fish biodiversity in inland waters of Turkey // *J. Acad. Doc. Fish. Aquac.* 2014. V. 1. № 3. P. 93–120.
18. Pereira L.H.G., Hanner R., Foresti F., Oliveira C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? // *BMC Genet.* 2013. V. 14. P. 20. doi 10.1186/1471-2156-14-20
19. Barman A.S., Singh M., Pandey P.K. DNA barcoding and genetic diversity analyses of fishes of Kaladan River of Indo-Myanmar biodiversity hotspot // *Mitochondrial DNA. Pt A.* 2017. doi 10.1080/24701394.2017.1285290
20. Kartavtsev Y.P., Batisheva N.M., Bogutskaya N.G. et al. Molecular systematics and DNA barcoding of Altai osmans, oreoleuciscus (pisces, cyprinidae, and leuciscinae), and their nearest relatives, inferred from sequences of cytochrome b (Cyt-b), cytochrome oxidase c (Co-1), and complete mitochondrial genome // *Mitochondrial DNA. Pt A.* 2017. V. 28. № 4. P. 502–517. doi 10.3109/24701394.2016.1149822
21. Kondo N.I., Nakagawa M., Matsuzaki S. et al. DNA barcoding, environmental DNA and an Ongoing attempt of detecting biodiversity in lake Kasumigaura // *J. Integr. F. Sci.* 2016. V. 13. P. 21–29.
22. Maranan J.B.D., Basiao Z.U., Quilang J.P. DNA barcoding of feral tilapias in Philippine lakes // *Mitochondrial DNA.* 2015. V. 1736. P. 1–12. doi 10.3109/19401736.2015.1089478
23. Overdyk L.M., Braid H.E., Crawford S.S., Hanner R.H. Extending DNA barcoding coverage for Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) across the three major basins of Lake Huron // *DNA Barcodes.* 2015. V. 3. № 1. P. 59–65. doi 10.1515/dna-2015-0007
24. Shen Y., Guan L., Wang D., Gan X. DNA barcoding and evaluation of genetic diversity in Cyprinidae fish in the midstream of the Yangtze River // *Ecol. Evol.* 2016. V. 6. № 9. P. 2702–2713. doi 10.1002/ece3.2060
25. Yang T., Meng W., Zhang R. et al. DNA barcoding of fishes in Irtysh River China // *Russ. J. Genet.* 2016. V. 52. № 9. P. 969–976.
26. Turanov S.V., Kartavtsev Yu.Ph., Lipinsky V.V. et al. DNA-barcoding of perch-like fishes (Actinopterygii: Perciformes) from far-eastern seas of Russia with taxo-

- onomic remarks for some groups // *Mitochondrial DNA*. 2016. V. 27. № 2. P. 1188–1209. doi 10.3109/19401736.2014.945525
27. Гордеева Н.В., Шаховской И.Б. Применение ДНК-баркодинга для идентификации видов и филогенетических исследований летучих рыб (Ехосоетidae) // *Вопр. ихтиол.* 2017. Т. 57. № 2. С. 212–221.
 28. Кодухова Ю.В., Карабанов Д.П. Морфологические изменения в популяции плотвы (*Rutilus rutilus*, Cyprinidae) озера Плещеево в результате вселения моллюска *Dreissena polymorpha* (Bivalvia) // *Зоол. журн.* 2017. Т. 96. № 9. С. 1069–1077.
 29. Ermakov O.A., Levina M.A., Titov S.V., Levin B.A. mtDNA-based identification of two widespread roach species (*Rutilus*, Cyprinidae) characterized by sympatric zone // *Inland Water Biol.* 2017. V. 10. № 1. P. 112–114. doi 10.1134/S1995082917010060
 30. Nedunoori A., Turanov S.V., Kartavtsev Y.P. Fish product mislabeling identified in the Russian far east using DNA barcoding // *Gene Reports*. 2017. V. 8. P. 144–149. doi 10.1016/j.genrep.2017.07.006
 31. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // *Proc. Biol. Sci.* 2003. V. 270. № 1512. P. 313–321. doi 10.1098/rspb.2002.2218
 32. Hebert P.D.N., Ratnasingham S., de Waard J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proc. Biol. Sci.* 2003. V. 270. Suppl. P. S96–S99. doi 10.1098/rsbl.2003.0025
 33. Ivanova N.V., Zemlak T.S., Hanner R.H., Hebert P.D.N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding // *Mol. Ecol. Notes*. 2007. V. 7. № 4. P. 544–548. doi 10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x
 34. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. BOLD: The barcode of life data system // *Mol. Ecol. Notes*. 2007. V. 7. № 3. P. 355–364. doi 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x
 35. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) system // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 7. doi 10.1371/journal.pone.0066213
 36. Becker S., Hanner R., Steinke D. Five years of FISH-BOL: Brief status report // *Mitochondrial DNA*. 2011. V. 22. № S1. P. 3–9. doi 10.3109/19401736.2010.535528
 37. Ward R.D., Hanner R., Hebert P.D.N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL // *J. Fish Biol.* 2009. V. 74. № 2. P. 329–356. doi 10.1111/j.1095-8649.2008.02080.x
 38. Ward R.D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. // *Mol. Ecol. Res.* 2009. V. 9. № 4. P. 1077–1085. doi 10.1111/j.1755-0998.2009.02541.x
 39. Collins R.A., Cruickshank R.H. The seven deadly sins of DNA barcoding. // *Mol. Ecol. Res.* 2013. V. 13. № 6. P. 969–975. doi 10.1111/1755-0998.12046
 40. Meyer C.P., Paulay G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. № 12. P. 1–10. doi 10.1371/journal.pbio.0030422
 41. Ardura A., Planes S., Garcia-Vazquez E. Applications of DNA barcoding to fish landings: Authentication and diversity assessment // *Zookeys*. 2013. V. 365. Spec. issue. P. 49–65. doi 10.3897/zookeys.365.6409
 42. Kress W.J., García-Robledo C., Uriarte M., Erickson D.L. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation // *Trends Ecol. Evol.* 2015. V. 30. № 1. P. 25–35. doi 10.1016/j.tree.2014.10.008
 43. Trivedi S., Aloufi A.A., Ansari A.A., Ghosh S.K. Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation: An update // *Saudi J. Biol. Sci.* 2016. V. 23. № 2. P. 161–171. doi 10.1016/j.sjbs.2015.01.001
 44. Барабанищиков Е.И., Шановалов М.Е., Свирский В.Г. Динамические процессы в ихтиоценое озера Ханка // *Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова*. 2011. № 5. С. 35–41.
 45. Барабанищиков Е.И., Назаров В.А., Свирский В.Г. Фауна круглоротых и рыб озера Ханка // *Изв. ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра)*. 2006. Т. 146. С. 97–110.
 46. Богуцкая Н.Г., Насека А.М. Круглоротые и рыбы бассейна озера Ханка (система реки Амур): Аннотированный список видов с комментариями по их таксономии и зоогеографии региона // *Науч. тетрадь ГосНИОРХ. СПб.*, 1996. С. 1–45.
 47. Богуцкая Н., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. 389 с.
 48. Свирский В.Г., Барабанищиков Е.И. Биологические инвазии как элемент антропогенного давления на сообщество гидробионтов озера Ханка // *Рос. журн. биологич. инвазий*. 2009. № 2. С. 29–35.
 49. Шедько С.В. Список круглоротых и рыб пресных вод побережья Приморья // *Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова*. 2001. № 1. С. 229–249.
 50. Шедько С.В., Шедько М.Б. Новые данные о пресноводной фауне юга Дальнего Востока России // *Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова*. 2003. № 2. С. 319–336.
 51. Таранец А.Я. Краткий определитель рыб советского Дальнего Востока и прилежащих вод // *Изв. ТИНРО*. 1937. Т. 11. С. 1–200.
 52. Никольский Г.В. Рыбы бассейна Амура. М.: Изд-во АН СССР, 1956. 551 с.
 53. Parin N.V., Evseenko S.A., Vasil'eva E.D. Fishes of the Russian Seas: Annotated Catalogue. М.: KMK Scientific Press, 2014. 733 p.
 54. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 931–957.
 55. Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H. et al. DNA barcoding Australia's fish species // *Philos. Trans. R. Soc.*

- Lond. Biol. Sci. 2005. V. 360. № 1462. P. 1847–1857. doi 10.1098/rstb.2005.1716
56. *Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. № 12. P. 2725–2729. doi 10.1093/molbev/mst197
57. *Edgar R.C.* MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 5. P. 1792–1797. doi 10.1093/nar/gkh340
58. *Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al.* Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403–410. doi 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
59. *Benson D.A., Clark K., Karsch-Mizrachi I. et al.* GenBank // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № D1. P. D30–D35. doi 10.1093/nar/gku1216
60. *Kimura M.* A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. V. 16. № 2. P. 111–120.
61. *Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P. et al.* MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // *Syst. Biol.* 2012. V. 61. № 3. P. 539–542. doi 10.1093/sysbio/sys029
62. *Weigt L.A., Driskell A.C., Baldwin C.C., Ormos A.* DNA barcoding fishes // *DNA Barcodes Methods Protoc.* 2012. P. 109–126.
63. *Chang C.-H., Li F., Shao K.-T. et al.* Phylogenetic relationships of Acheilognathidae (Cypriniformes: Cyprinoidea) as revealed from evidence of both nuclear and mitochondrial gene sequence variation: evidence for necessary taxonomic revision in the family and the identification of cryptic species // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2014. V. 81. P. 182–194. doi 10.1016/j.ympev.2014.08.026
64. *Богущая Н.Г.* Объем и морфологические особенности подсемейства Leuciscinae карповых рыб (Cyprinidae) // Труды зоологического института АН СССР. 1988. Т. 181. С. 96–113.
65. *Никольский Г.В.* Частная ихтиология. М.: Сов. Наука, 1950. 436 с.
66. *Schönhuth S., Vukić J., Šanda R. et al.* Phylogenetic relationships and classification of the Holarctic family Leuciscidae (Cypriniformes: Cyprinoidei) // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018. V. 127. P. 781–799. doi 10.1016/j.ympev.2018.06.026
67. *Naseka A.M., Bogutskaya N.G.* Contribution to taxonomy and nomenclature of freshwater fishes of the Amur drainage area and the Far East (Pisces, Osteichthyes) // *Zoosystematica Rossica.* 2004. V. 12. № 2. P. 279–290.
68. *Bogutskaya N.G., Naseka A.M., Shedko S.V. et al.* The fishes of the Amur river: updated check-list and zoogeography // *Ichthyological Explor. Freshwaters.* 2008. V. 19. № 4. P. 301–366.
69. *Насека А.М.* Сравнительно-морфологические основы системы карповых рыб подсемейства пескаревых (Gobioninae, Cyprinidae) мировой фауны: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: СПб гос. ун-т, 1998. 18 с.
70. *Naseka A.M.* Major patterns of phenotypic diversity, phylogeny and systematics of the gudgeons (Teleostei: Cypriniformes: Gobioninae) // Conference: Joint Meeting of Ichthyologists and Herpetologists. New Orleans, USA, 13–17 July, 2006. <http://www.researchgate.net/publication/277721006>.
71. *Курдяева В.П., Шкарина Т.В.* К биологии мелкочешуйного желтопера *Plagiognathops microlepis* (Bleeker) и подуста-чернобрюшки *Xenocypris macrolepis* Bleeker озера Ханка // *Изв. ТИНРО-центра.* 1998. Т. 123. С. 299–318.
72. *Шаповалов М.Е., Курдяева В.П.* Особенности размножения уклееподобных (Cultrinae, Cyprinidae) озера Ханка // Проблемы сохранения водно-болотных угодий международного значения: озеро Ханка: Тр. второй междунар. науч.-практич. конф. Спасск-Дальний, 10–11 июня 2006 г. Владивосток, 2006. С. 74–94.

The First Attempt of Studying the Species Diversity of Fish in the Lake Khanka Using DNA Barcoding Techniques

S. V. Turanov^{a, b, *}, Y. Ph. Kartavtsev^{a, c}, and M. E. Shapovalov^d

^a*Zhirmunsky Institute of Marine Biology, National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia*

^b*Department of Water Biological Resources and Aquaculture, Far East State Technical Fisheries University, Vladivostok, 690087 Russia*

^c*Department of Biodiversity and Marine Bioresources, Far East Federal University, Vladivostok, 690059 Russia*

^d*Pacific Research Fisheries Centre, Vladivostok, 690091 Russia*

*e-mail: sturcoal@mail.ru

Khanka is the largest lake on the north-eastern part of Asia comprising the valuable part of the freshwater fisheries resources. Lake Khanka has a low value of endemism due to the recent origin and connection to large river systems of Amur and Ussuri. The fish species composition of the lake is constantly updated due to invasions that occur both unintentionally and because of the introduction of hydrobionts to maximize the po-

tential of natural productivity. In this regard, the Lake Khanka is a suitable ground for the development and implementation of complex methods for monitoring species diversity. The cases of invasion has become more often in the lake recently. Moreover, the introduction of some fish species for stabilization of relationships among communities and exhaustive utilization of the natural productivity is now carrying out, which makes challenging the development and implementation of powerful techniques for monitoring of the local fauna species diversity. Here for the first time we present the complex approach to the solution of that problem. We collected 64 fish specimens from 17 species representing 4 families of ray-fined fishes and analyzed their taxonomy and species diversity using both classic methods and DNA barcoding techniques. Specimens have been genotyped on *Co-1* mitochondrial gene marker. Mean values of *K2P*-corrected intraspecific genetic distances were $0.15 \pm 0.01\%$, distances between different species within the same genera were $4.08 \pm 0.01\%$. Phylogenetic analysis revealed monophyletic origin of all species clusters with large support (98–100% of bootstrap values). Thus, reciprocal complement of morphological and genetic techniques for the purpose of species delimitation and high effectiveness of DNA barcoding in application for documentation of species diversity in the lake Khanka has been demonstrated. New molecular genetic data generally is in agreement with taxonomic relationships shown for these fish taxa before, but it is required an additional investigation to verify the composition of genus *Acheilognathus* in the lake Khanka.

Keywords: fish species diversity, Lake Khanka, DNA barcoding, *Co-1*.