

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЧЕТЫРЕХРОГОВОГО
КЕРЧАКА *Myoxocephalus quadricornis* (Linnaeus, 1758)
И ЕГО ПОЛОЖЕНИЕ В ТРИБЕ *Myoxocephalini* Taranetz
(Cottidae: *Myoxocephalinae*)

© 2023 г. И. Н. Морева^{1, 2, *}, О. А. Радченко², А. В. Петровская²

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

²Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Магадан, 685000 Россия

*e-mail: irruz@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 27.04.2022 г.

Принята к публикации 11.05.2022 г.

Проведено молекулярно-генетическое и кариологическое исследование четырехрогвого керчака *Myoxocephalus quadricornis* (Linnaeus, 1758). Впервые изучен кариотип и приведены результаты Ag-окрашивания хромосом экземпляров вида из Восточно-Сибирского моря. Кариотип *M. quadricornis* стабилен, содержит 32 (10 метацентриков, 2 субметацентрика, 20 субтелоцентриков) хромосомы, число хромосомных плеч – 44. Ядрышковые организаторы выявлены в теломерных районах коротких плеч двух гомологичных субтелоцентриков среднего размера. Обнаружена изменчивость по числу ядрышкообразующих хромосом и окрашиваемых блоков ядрышковых организаторов. Общие признаки в хромосомных наборах *M. quadricornis* и *Megalocottus platycephalus* указывают на их более значительную близость по сравнению с видами рода *Myoxocephalus*. Результаты кариологического анализа согласуются с молекулярно-генетическими данными о сестринских отношениях *M. quadricornis* и *Megalocottus platycephalus*. Выявлен комплекс кариологических и молекулярно-генетических признаков, позволяющих надежно отличать *M. quadricornis* от видов трибы *Myoxocephalini* и свидетельствующих о необходимости его выведения из рода *Myoxocephalus*.

Ключевые слова: триба *Myoxocephalini*, кариотип, маркерные хромосомы, ядрышковые организаторы (ЯО), митохондриальная ДНК, генетическая дифференциация.

DOI: 10.31857/S0016675823020066, **EDN:** KXUTDG

Арктический циркумполярный вид *Myoxocephalus quadricornis* – один из наиболее широко распространенных представителей подсемейства *Myoxocephalinae*. Кроме арктических морей он обитает в Северной Пацифике и Атлантике, южнее Берингова пролива до Анадырского лимана и залива Нортон, по атлантическому побережью Северной Америки до Лабрадора [1–3]. Рогатка встречается в хорошо прогреваемых водах с соленостью не выше 24‰, преимущественно 5–12‰, на глубинах от 0 до 50 м, а также в эстуариях и верховьях рек до 150 км от моря [4–6]. В отличие от видов подсемейства *Myoxocephalinae*, ведущих морской образ жизни, рогатка обитает в ряде крупных озер Евразии и Северной Америки, часть из которых не имеет сообщения с морем [7]. В озерах этот бычок образует реликтовые жилые формы. По мнению специалистов, реликтовые формы из озер Северной Америки и Европы произошли от

арктических морских *M. quadricornis*, вытесненных на юг, в пресноводные места обитания, в результате наступления ледников в раннем и среднем плейстоцене [5, 8–10]. Пресноводные рогатки, в отличие от морских, глубоководные, обитают при очень низкой температуре в хорошо насыщенной кислородом воде [4, 5]. В двух крупнейших озерах Канады этот бычок обнаружен на глубине около 366 м [11]. Несмотря на то что жилые формы считаются пресноводными, они способны обитать в солоноватых и сильно соленых водах [5].

Разнообразные условия обитания и географическая изоляция пресноводных жилых форм, морских и пресноводных популяций стали причиной возникновения значительной изменчивости морфологических признаков вида. Например, различия в числе позвонков; наличие/отсутствие заглазничных и затылочных бугров, бугорков ниже боковой линии; различия размеров и формы за-

глазничных и затылочных бугров [12–14]. В результате исследования мтДНК обнаружены генетические отличия североамериканской континентальной глубоководной рогатки от арктических морских и не имеющих выхода к морю популяций [9]. Вследствие разных точек зрения на значимость обнаруженных различий единое мнение о видовой и внутривидовой систематике рогаток отсутствует [1, 6].

До настоящего времени не решен вопрос о том, к какому роду относится рогатка. На основании изучения морфологических признаков, преимущественно сейсмодатированной системы, этих бычков относят к роду *Triglopsis* Girard, 1851 [1]. В результате ДНК-штрихкодирования рогатка была включена в род *Myoxocephalus* Tilesius, 1811 [15]. Последующее изучение мтДНК видов рода *Myoxocephalus* показало, что *M. quadricornis* и остальные его виды принадлежат к разным филогенетическим группам [16]. Установлена близость четырехрового керчака с *Megalocottus platycephalus* (Pallas, 1814), предложено включить *M. quadricornis* в состав рода *Megalocottus* Gill, 1861 [17].

Для решения вопроса о положении четырехрового керчака в системе подсемейства *Myoxocephalinae* необходимы дальнейшие исследования, в том числе генетическими методами. До настоящего времени самостоятельные работы по кариологической и молекулярно-генетической дифференциации этого вида отсутствовали. Цель нашей работы – с помощью рутинного и Ag-окрашиваний изучить хромосомный набор *Myoxocephalus quadricornis*, сравнить его с кариотипами видов родов *Myoxocephalus* и *Megalocottus*, сопоставить кариологические результаты с данными анализа изменчивости генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК мтДНК, определить степень генетической дифференциации и родственные связи рогатки. В настоящем исследовании состав трибы *Myoxocephalini* (роды *Myoxocephalus* и *Megalocottus*) приведен по Неелову (1979), исключая род *Triglopsis*. В соответствии с каталогом рыб Мирового океана *Triglopsis quadricornis* является младшим синонимом *Myoxocephalus quadricornis* [18].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объем исследованного материала приведен в табл. 1. Рыбы выловлены сетями в июле 2021 г., в устье р. Пучеев (бассейн Чаунской губы Восточно-Сибирского моря). Видовая принадлежность экземпляров определена по морфологическим признакам [1]. Часть материала для молекулярно-генетического анализа (№ 2260, 2271, 2274, 2273) любезно предоставлена Валентиной Сиделевой (лаборатория ихтиологии Зоологического института РАН).

Кариологический анализ

Изучены кариотипы восьми самок, трех самцов *Myoxocephalus quadricornis*. Хромосомные препараты приготовлены из суспензии клеток переднего отдела почки рыб методом воздушного высушивания [19]. Для первичного анализа кариотипа хромосомы окрашивали 4%-ным раствором красителя Гимза (Giemsa). После просмотра под микроскопом и съемки лучших метафазных пластинок препараты отмывали в 70%-ном этиловом спирте. Затем для выявления активных ЯО на тех же препаратах проводили Ag-окрашивание [20].

Использовали общепринятую в цитогенетических исследованиях классификацию хромосом [21]. Равноплечие метацентрические (М) и неравноплечие субметацентрические (СМ) хромосомы относили к двуплечим, субтелоцентрические (СТ) с очень коротким вторым плечом и акроцентрические (А) с невидимым вторым плечом – к одноплечим хромосомам.

Для сравнительного анализа привлечены данные о кариотипах шести видов рода *Myoxocephalus* и *Megalocottus platycephalus* (северной *Megalocottus platycephalus platycephalus* (Pallas, 1814) и южной *M. p. taeniopterus* (Kner, 1868) дальневосточных широколобок) [22–25]. Хромосомные наборы *Megalocottus p. platycephalus* и *M. p. taeniopterus* сходны ($2n = 42$, $NF = 44 + 2$). В кариотипах изученных видов пара хромосом с изменчивой морфологией обозначена как субмета-субтелоцентрик (СМ-СТ) [16].

Молекулярно-генетический анализ

Проведен анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК мтДНК *Myoxocephalus quadricornis* и видов трибы *Myoxocephalini*. Четыре вида семейства Cottidae из подсемейств *Myoxocephalinae* (*Microcottus sellaris* (Gilbert, 1895), *Porocottus minutus* (Pallas, 1814), *Argyrocottus zanderi* (Herzenstein, 1892)) и *Pseudoblenniinae* (*Alcichthys elongatus* Steindachner, 1881) использованы как внешняя группа. Геномная ДНК выделена из мышечной ткани по стандартной методике, включающей лизис ткани 1% SDS в присутствии протеиназы К (0.2 мг/мл) и депротенинизацию фенолом [26]. Условия амплификации и секвенирования ДНК, последовательности олигонуклеотидных праймеров использованы из предшествующей работы: *COI* – F-33 и R-1421; цитохром *b* – L14795 и H15844; *16S* рРНК – L2510 и H3080 [27]. Секвенирование ДНК выполнено на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в лаборатории генетики Института биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан, Россия.

Попарные генетические дистанции рассчитаны для объединенных последовательностей генов

Таблица 1. Список исследованных экземпляров *Myoxocephalus quadricornis*, видов трибы *Myoxocephalini* и внешней группы (* – образцы изучены кариологически)

Вид (№ образца)	Район сбора	Номер в GenBank		
		<i>COI</i>	<i>I6S</i> рРНК	цит. <i>b</i>
<i>Myoxocephalus quadricornis</i> (2079)	Восточно-Сибирское море, Чаунская губа, устье р. Пучевеем	MN877736	MN871888	MN877761
<i>M. quadricornis</i> (2167)	»	MN877737	MN871889	MN877762
<i>M. quadricornis</i> (2308)*	»	OM758098	OM758108	OM801278
<i>M. quadricornis</i> (2309)*	»	OM758099	OM758109	OM801279
<i>M. quadricornis</i> (2310)*	»	OM758100	OM758110	OM801280
<i>M. quadricornis</i> (2311)*	»	OM758101	OM758111	OM801281
<i>M. quadricornis</i> *	»	–	–	–
<i>M. quadricornis</i> *	»	–	–	–
<i>M. quadricornis</i> *	»	–	–	–
<i>M. quadricornis</i> *	»	–	–	–
<i>M. quadricornis</i> *	»	–	–	–
<i>M. quadricornis</i> *	»	–	–	–
<i>M. quadricornis</i> *	»	–	–	–
<i>M. quadricornis</i> (2260)	Белое море, Кандалакшский з.	OM758102	OM758112	OM801282
<i>M. quadricornis</i> (2271)	»	OM758103	OM758113	OM801283
<i>M. quadricornis</i> (2274)	»	OM758104	OM758114	OM801284
<i>M. scorpius</i> (2273)	»	OM758105	OM758115	OM801285
<i>M. stelleri</i> (1754)*	Японское море, з. Восток	KY062754	KY062665	MH595735
<i>M. jaok</i> (1772)*	Охотское море, б. Шестакова	MN877722	MN871874	MN877747
<i>M. polyacanthocephalus</i> (1745)*	О-в Шикотан, б. Горобец	MN115338	MN097194	MN115374
<i>M. ochotensis</i> (1900)*	Охотское море, з. Одян	MH595733	MH588265	MH595734
<i>M. brandtii</i> (1988)*	Татарский пролив, з. Шебунина	MN877732	MN871884	MN877757
<i>Megalocottus platycephalus</i> (1790)	Охотское море, б. Шестакова	MH016197	MH012123	MH016217
<i>Microcottus sellaris</i> (2157)*	Японское море, о-в Русский	MN877738	MN871890	MN877763
<i>Porocottus minutus</i> (1934)*	Охотское море, о-в Недоразумения	MH172269	MH167465	MH172287
<i>Argyrocottus zanderi</i> (1734)	О-в Шикотан, б. Крабовая	MN877739	MN871891	MN877764
<i>Alcichthys elongatus</i> (2000)	Японское море, з. Восток	MH172282	MH167478	MH172300

COI, цитохрома *b*, *I6S* рРНК мтДНК в программе MEGA X методом максимального правдоподобия (ML) с учетом гетерогенности скорости нуклеотидных замен (гамма-распределение G). Оптимальные модели нуклеотидных замен выбраны с использованием информационного критерия BIC (Bayesian Information Criterion) в программе MEGA X. Филогенетический анализ выполнен методом байесовского анализа в программе MrBayes v3.2.1 [28]. Для контроля динамики байесовского анализа использована программа Tracer v1.7 [29]. Установки для анализа МСМС были

следующие: четыре цепи, 1000000 генераций и отбор деревьев через каждые 100 генераций. Значения вероятности достигли плато в течение 12000–15000 генераций. Значения логарифмической вероятности увеличились с менее чем –6976.890 до примерно –3843.392 в первых 5000 генераций, затем примерно до –3787.602 после 500000 генераций. Из 10001 дерева первые 1001 с нестабильными параметрами моделей нуклеотидных замен были отброшены, а остальные использовались для получения консенсусных деревьев и апостериорных вероятностей их ветвления. Узлы ветвления с оцен-

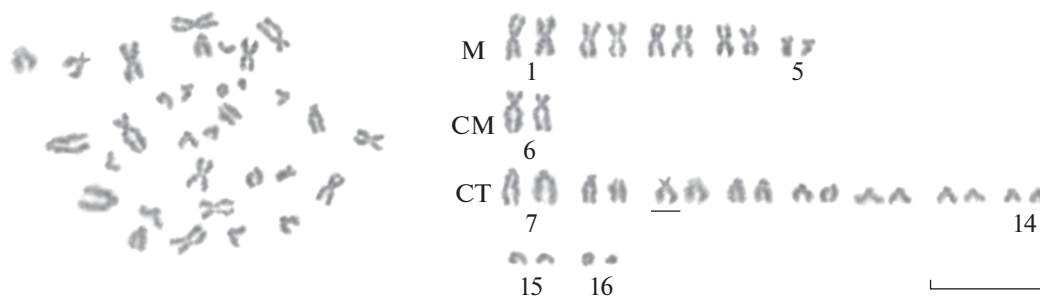


Рис. 1. Метафазная пластинка и кариограмма *M. quadricornis* — $2n = 32$, $NF = 44$. Цифры (здесь и на рис. 2, 3) — порядковые номера пар хромосом в кариограмме. Хромосома изменчивой морфологии подчеркнута. Масштабная линейка: 10 мкм.

ками вероятности $\geq 95\%$ приняты как достоверные [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кариологический анализ

Описание кариотипа *Myoxocephalus quadricornis* составлено по результатам анализа 300 рутинно окрашенных метафазных пластинок. Кариотип состоит из 32 хромосом ($2n$), число хромосомных плеч (NF) — 44 (рис. 1). Двуплечие хромосомы представлены парой крупных метацентриков (пара 1). Следующие три пары метацентриков (пары 2, 3, 4) — среднего размера. Метацентрики пятой пары среди двуплечих хромосом (пары 1–6) имеют самые мелкие размеры. Субметацентрики вида (пара 6) соответствуют по размерам его крупным метацентрикам (пара 1). Ряд одноплечих хромосом состоит из пары крупных субтелоцентриков (пара 7), короткие плечи которых, независимо от степени их спирализации, всегда хорошо выражены. Размеры этих субтелоцентриков сходны с размерами крупных метацентриков и субметацентриков (пары 1, 6) вида. У остальных девяти пар субтелоцентриков (пары 8–16), в разных метафазных пластинках, короткие плечи могут быть выражены в разной степени, но достаточной для того чтобы выделить их в отдельный, плавно уменьшающийся по размерам ряд. Пять пар метацентриков, пара крупных субметацентриков и пара крупных субтелоцентриков хорошо идентифицируются во всех исследованных метафазных пластинках и рассматриваются нами как маркерные в кариотипе *M. quadricornis*. Изменчивость по числу хромосом не обнаружена, различий по $2n$ и NF между кариотипами самцов и самок не выявлено.

Установлены общие признаки кариотипов *M. quadricornis* и изученных видов трибы *Myoxocephalini*. Четырехрогий керчак имеет одинаковое число хромосомных плеч (44) с *M. jaok* (Cuvier, 1829) и *M. scorpius* (Linnaeus, 1758) (рис. 1; рис. 2, а, б). У *M. quadricornis* так же, как у *Megalocottus p. taenior-*

terus, при рутинном окрашивании наблюдается вариабельность размера короткого плеча одного из гомологов пары субтелоцентриков (рис. 1: пара 9; рис. 3, а: пара 5). В кариотипах видов можно выделить сходные по морфологии и размерам маркерные хромосомы.

Крупные метацентрики (рис. 1: пара 1) *M. quadricornis* соответствуют крупным метацентрикам *M. jaok* (рис. 2, а: пара 1); вторая и третья пары метацентриков четырехрогового керчака (рис. 1) — второй паре метацентриков у *M. jaok* (рис. 2, а); метацентрики 4-й пары (рис. 1) вида — метацентрикам *M. jaok* (рис. 2, а: пара 3), *M. scorpius* (рис. 2, б: пара 1), *M. stelleri* Tilesius, 1811 (рис. 2, в: пара 1) и *M. polyacanthocephalus* (Pallas, 1814) (рис. 2, з: пара 1). Мелкие метацентрики *M. quadricornis* (рис. 1: пара 5) сходны с таковыми у *M. jaok* (рис. 2, а: пара 8), *M. polyacanthocephalus* (рис. 2, з: пара 2), *M. ochotensis* Schmidt, 1929 (рис. 2, е: пара 1) и *Megalocottus platycephalus* (рис. 3, а: пара 1). Субметацентрики рогатки (рис. 1: пара 6) соответствуют по размеру субметацентрикам *M. jaok* (рис. 2, а: пары 9, 10), *M. scorpius* (рис. 2, б: пара 2) и *M. stelleri* (рис. 2, в: пара 2).

С помощью Ag-окрашивания проанализированы 210 метафазных пластинок вида. Активные ЯО локализованы в теломерных районах коротких плеч гомологичных субтелоцентриков средних размеров (рис. 4). В метафазных пластинках наблюдалась изменчивость в виде разного числа (одна или две) ядрышкообразующих хромосом (ЯО-хромосом) и по числу окрашиваемых блоков ЯО в хромосоме (рис. 4). В 45% метафазных пластинок окрашивались одинарные, в 40% — двойные и в 15% — тройные блоки ЯО. Число окрашиваемых ядрышек в интерфазных ядрах — одно или два.

Молекулярно-генетический анализ

Нуклеотидные последовательности участков генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК размещены в GenBank/NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), их регистрационные номера указаны в табл. 1. Обнару-

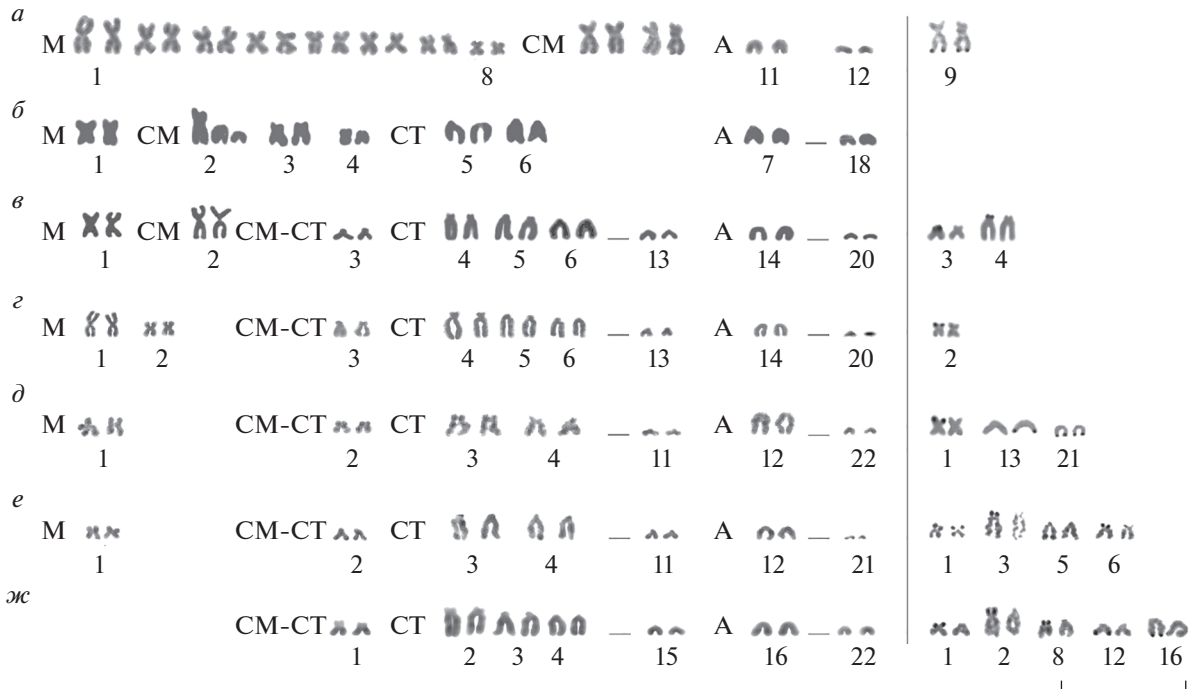


Рис. 2. Слева: кариограмма *Myoxocephalus jaok* – $2n = 24$, $NF = 44$ (a) и фрагменты кариограмм *M. scorpius* – $2n = 36$, $NF = 44$ (б, по: Васильев, 1985, с изменениями), *M. stelleri* – $2n = 40$, $NF = 44 + 2$ (в), *M. polyacanthocephalus* – $2n = 40$, $NF = 44 + 2$ (г), *M. brandtii* – $2n = 44$, $NF = 46 + 2$ (д), *M. ochotensis* – $2n = 42$, $NF = 44 + 2$ (е) и *M. stelleri* – $2n = 44$, $NF = 44 + 2$ (ж); справа: YO-хромосомы видов (по: Морева, Борисенко, 2017). Прочерк – СТ и А хромосомы среднего и мелкого размера пропущены. Масштабная линейка: 10 мкм.

жены следующие показатели генетической изменчивости видов трибы *Myoxocephalini*. Для гена *COI* (1008 пар нуклеотидов, пн) идентифицировано 154 нуклеотидные замены и 149 полиморфных сайтов, 94 (9.3%) из которых филогенетически информативные. Из 336 кодируемых аминокислотных остатков варибельных нет. Для гена цитохрома *b* (747 пн) идентифицировано 142 нуклеотидные замены и 131 полиморфный сайт, 90 (12.1%) из которых филогенетически информативные. Из 249 кодируемых аминокислотных остатков пять варибельных. Для гена *16S* рРНК (600 пн) идентифицировано 15 нуклеотидных замен и 12 полиморфных сайтов, 11 (1.8%) из которых филогенетически информативные.

Показатели генетической изменчивости *M. quadricornis* следующие. Для гена *COI* идентифицировано 11 нуклеотидных замен и 11 полиморфных сайтов, шесть (0.6%) из которых филогенетически информативные. Для гена цитохрома *b* идентифицировано 16 нуклеотидных замен и 16 полиморфных сайтов, 10 (1.4%) из которых филогенетически информативные; из 249 кодируемых аминокислотных остатков четыре варибельных. Для гена *16S* рРНК идентифицировано три нуклеотидные замены и три полиморфных сайта, два (0.3%) из которых филогенетически информативные. У ротатки обнаружено восемь гаплотипов.

Во всех исследованных генах обнаружены мутации, маркирующие вид *M. quadricornis* и отличающие его от видов рода *Myoxocephalus*: 40, 30 и 4 замены нуклеотидов для генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК. В соответствии с данными табл. 2 значения ML-дистанций между мтДНК *M. quadricornis* и внешней группы варьируют от 7.06% (*M. quadricornis*/*Microcottus sellaris*) до 12.7% (*M. quadricornis*/*Alcichthys elongatus*). Между *M. quadricornis* и видами рода *Myoxocephalus* минимальное значение составило 6.93% (с *M. stelleri*, *M. polyacanthocephalus* и *M. ochotensis*), максимальное – 7.54% (с *M. brandtii*). Генетические дистанции между *M. quadricornis* и *Megalocottus platycephalus* варьируют от 2.75 до 2.88%. Среднее значение ML-дистанций в пределах *M. quadricornis* составило 0.45%.

По данным об объединенных последовательностях мтДНК реконструировано байесовское филогенетическое дерево (рис. 5). В основании находятся ДНК видов внешней группы, исключая *Microcottus sellaris*. Триба *Myoxocephalini* разделяется на кластер видов *Myoxocephalus* и кластер *M. quadricornis* вместе с *Megalocottus platycephalus*. К последнему кластеру присоединяется *Microcottus sellaris*. Оценки апостериорной вероятности ($PP \geq 0.95$) подтверждают достоверность ассоциаций типов ДНК.

ОБСУЖДЕНИЕ

В Восточно-Сибирском море рогатка – один из обычных видов морских прибрежных рыб [31, 32]. Так же как экземпляры вида от арктического побережья Аляски бычок из этой части ареала характеризуется сильным развитием на голове губчатых заглазничных и затылочных бугров, имеющих грибовидную форму. По мнению специалистов северная форма – подвид рогатки и должна иметь название *Triglopsis quadricornis polaris* (Sabine, 1821) [6]. Цитогенетические исследования особей вида из Восточно-Сибирского моря не проводились. В литературных источниках есть формула кариотипа *M. quadricornis* (*Triglopsis quadricornis*) из Белого моря [33]. Исходя из формулы кариотипа – $2n = 32$ (12M/CM + 20СТ), NF = 44 [33: по 34] и полученных нами результатов, морские представители *M. quadricornis*, как и большинство изученных ранее видов рода *Myoxocephalus* и *Megalocottus platycephalus*, стабильны по числу хромосом. Исключением являются *M. scorpius* и *M. stelleri*, для которых описан полиморфизм по центрическому слиянию [22, 27].

Дифференциация бычков по основным признакам кариотипов

На основе проведенных исследований установлено, что *M. quadricornis* по $2n$ отличается от всех изученных видов *Myoxocephalus* (рис. 2) и *Megalocottus platycephalus* (рис. 3,а). Обнаруженное отличие может являться следствием разного числа робертсоновских транслокаций, произошедших в процессе эволюции хромосомных наборов бычков. Изучение рыб подсемейства *Myoxocephalini* показало, что робертсоновские транслокации – это основной механизм эволюционного изменения кариотипов не только видов трибы *Myoxocephalini*, но и представителей триб *Microcottini* Neelov и *Eophryini* Taranetz [22, 35].

В кариотипах бычков рода *Myoxocephalus* (кроме *M. jaok*, *M. scorpius*) и *Megalocottus platycephalus* есть пара мелких субмета-субтелоцентриков (рис 2,в, г: пара 3,д, е: пара 2,ж: пара 1; рис. 3,а: пара 2). В разных клетках бычков в зависимости от длины коротких плеч они могут выглядеть как двуплечие или как одноплечие хромосомы, поэтому в NF указаны два дополнительных хромосомных плеча: $46 + 2$ и $44 + 2$ [16]. *M. jaok* резко отличается от всех видов рода *Myoxocephalus*. Его кариотип преимущественно представлен двуплечими хромосомами (рис. 2,а). При этом уровень дифференциации мтДНК *M. jaok* и остальных видов соответствует межвидовым различиям в этом роде [16]. У *M. scorpius* выделить субмета-субтелоцентрики не представляется возможным из-за сильной спирализации хромосом в представленной автором кариограмме [22]. У *M. quadricornis* эта пара хромосом



Рис. 3. Кариограмма – $2n = 42$, NF = 44 + 2 (а) и фрагменты кариограмм с ЯО-хромосомами с одинарными и двойными блоками ЯО у *M. platycephalus taeniopterus* (б); с одинарными, двойными и тройными блоками ЯО у *Megalocottus p. platycephalus* (в) (по: Морева, Борисенко, 2015, с изменениями). ЯО-хромосомы подчеркнуты. Масштабная линейка: 10 мм.

отсутствует. Большинство хромосом в метафазных пластинках вида хорошо идентифицируется. Исключением является один из гомологов пары субтелоцентриков (рис. 1: пара 9). В исследованных метафазных пластинках (55%) *M. quadricornis* эта хромосома имеет второе плечо большего размера, чем у субтелоцентриков.

В отличие от большинства видов рода *Myoxocephalus* и *Megalocottus platycephalus* (рис. 2,б: пары 5, 6,в, г: пары 4, 5, д, е: пары 3, 4, ж: пары 2, 3; рис. 3,а: пары 3, 4), *M. quadricornis* имеет только одну пару крупных субтелоцентриков (рис. 1: пара 7). Возможно, причиной отсутствия у него второй пары маркерных хромосом этой морфологии является вовлечение их в робертсоновскую транслокацию. Размеры маркерных субтелоцентриков рогатки крупнее размеров маркерных субтелоцентриков видов рода *Myoxocephalus* и *Megalocottus platycephalus*. В отличие от четырехрогвого керчака у *M. stelleri*, *M. polyacanthocephalus*, *M. brandtii* и *Megalocottus platycephalus* можно выделить еще одну пару крупных одноплечих хромосом (рис. 2,в, г: пара 6, д: пара 12,ж: пара 4; рис. 3,а: пара 18) маркерную для этих видов. У *M. quadricornis* остальные субтелоцен-

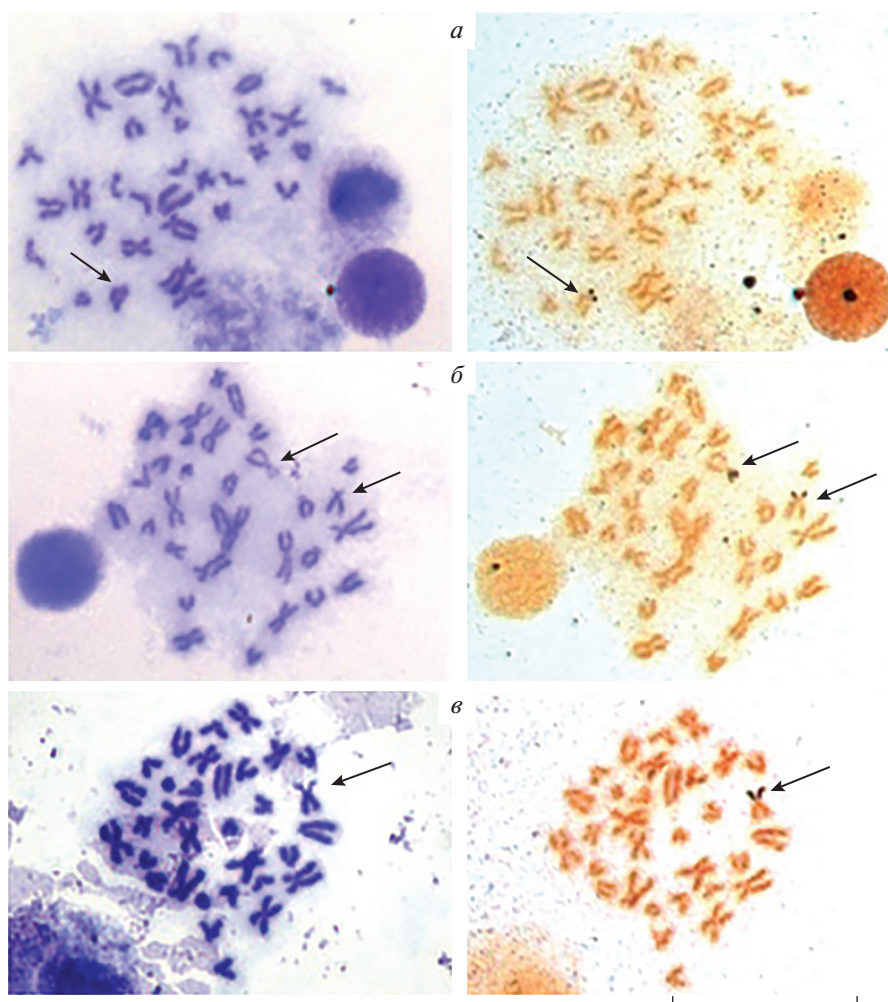


Рис. 4. Справа: метафазные пластинки *M. quadricornis* – рутинное окрашивание, слева: те же метафазные пластинки – Ag-окрашивание. ЯО-хромосомы с одинарными (а), двойными (б) и тройными (в) блоками ЯО указаны стрелками. Масштабная линейка: 10 мкм.

трические хромосомы – среднего и мелкого размера. В хромосомном наборе *M. quadricornis* отсутствуют акроцентрики, имеющиеся в кариотипах всех изученных видов *Мухоcephalus* и *Megalocottus*.

Дифференциация кариотипов бычков по числу и локализации активных ЯО

В кариотипах большинства исследованных видов рода *Мухоcephalus* активные ЯО расположены в двух и более парах хромосом (рис. 2, в, д, е, ж). В отличие от них у *M. quadricornis* ЯО имеются лишь в одной паре субтелоцентриков. ЯО в субтелоцентриках средних размеров, как один из вариантов локализации, встречается в кариотипах *M. ochotensis* и *M. stelleri* (при $2n = 44$). Однако ЯО-хромосомы *M. stelleri* (рис. 2, ж: пара 8) мельче, чем у *M. quadricornis*. Четырехрогий керчак и *M. ochotensis* различаются по локализации ЯО (рис. 2, е: пара 5; рис. 4). У *M. jaok* и у *M. polyacan-*

thocephalus так же, как и у *M. quadricornis*, ЯО расположены в одной паре хромосом, но у всех трех видов морфология ЯО-хромосом различна (рис. 2, а: пара 9, г: пара 2; рис. 4).

Несмотря на сходство хромосомных наборов *Megalocottus platycephalus platycephalus* и *M. p. taeniopterus*, они хорошо дифференцируются по числу и локализации активных ЯО (рис. 3). *M. quadricornis* отличается от *Megalocottus p. taeniopterus* по числу ЯО (рис. 3, б: пары 5, 18). Размеры ЯО-хромосом четырехрогого керчака (рис. 1: пара 9) и субтелоцентрических ЯО-хромосом *Megalocottus p. taeniopterus* (рис. 3, а: пара 5) сходны. У *Megalocottus p. platycephalus* так же, как и у *M. quadricornis*, ЯО локализованы в одной паре хромосом. Однако у северной дальневосточной широколобки ЯО окрашиваются в крупных субтелоцентриках (рис. 3, в: пара 3). У четырехрогого керчака, северной и южной дальневосточных широколобок наблюдается изменчивость морфологии ЯО-хромосом. У

M. quadricornis и *Megalocottus p. platycephalus* ЯО выявляются в виде одинарных, двойных и тройных хорошо различимых блоков; у *Megalocottus p. taeniopterus* — в виде одинарных и двойных блоков. В зависимости от числа блоков ЯО длина коротких плеч заметно изменяется, а хромосомы могут выглядеть (как при рутинном, так и при Ag-окрашивании) у *Megalocottus p. taeniopterus* как субтело-, субметацентрики (рис. 3,б), у *Megalocottus p. platycephalus* и *M. quadricornis* как субтело-, субметаили даже метацентрики, (рис. 3,в; рис. 4). Идентификация данных пар хромосом у бычков возможна только после Ag-окрашивания.

Генетическая дифференциация *Myoxocephalus quadricornis*

Единое мнение о статусе вида *M. quadricornis* отсутствует. Его относят к роду *Triglopsis* [1, 36, 37], рассматривают в составе рода *Myoxocephalus* [2, 3], объединяют с *M. thompsonii* в комплекс видов или разделяют на подвиды *M. quadricornis quadricornis* и *M. q. thompsonii* [9, 38, 39].

Сравнительный кариологический анализ показал, что, несмотря на наличие общих признаков, *M. quadricornis* значительно отличается от видов рода *Myoxocephalus* по числу и морфологии хромосом, от большинства видов этого рода по числу хромосомных плеч. Самые значительные различия между ними заключаются в числе и локализации активных ЯО. Полученные данные полностью согласуются с результатами молекулярно-генетического исследования этих рыб. В предшествующей работе был проведен молекулярно-генетический анализ рода *Myoxocephalus*, в котором использовано два экземпляра четырехрогвого керчака из восточной части Арктики — Восточно-Сибирского моря [16]. В настоящей работе расширение выборки до девяти экземпляров и привлечение *M. quadricornis* из западной части Арктики (Белое море) подтвердило ранее полученные данные о значительных генетических отличиях *M. quadricornis* от остальных видов рода *Myoxocephalus*.

Значения ML-дистанций между видами рода *Myoxocephalus* варьируют в широких пределах — от 1.53 до 7.54% (табл. 2). Большой вклад в столь высокий уровень генетической дифференциации внутри рода вносят отличия мтДНК *M. quadricornis*, величина которых составляет в среднем 7.13%. Такая оценка соответствует различиям между видами близкородственных родов подсемейства *Myoxocephalinae*, но никак не различиям между видами одного рода. Например, ML-дистанции между *Microcottus sellaris* и *M. quadricornis*, которые принадлежат к близким родам, составляют 7.06—7.37%. Напротив, дистанции между *M. scorpius* и остальными видами рода *Myoxocephalus*, исключая *M. quadricornis*, составляют 3.36—3.97%, что в среднем в 2 раза ниже дистанций между видами разных родов.

На филогенетическом дереве (рис. 5) кластер мтДНК *M. quadricornis* располагается отдельно от кластера видов рода *Myoxocephalus*. Он образует общую группу с видами из других родов подсемейства *Myoxocephalinae*. При этом *M. quadricornis* наиболее близок с *Megalocottus platycephalus*. Генетические дистанции между ними соответствуют различиям между видами одного рода (среднее значение 2.8%). Достоверность положения *M. quadricornis*, обособленного от рода *Myoxocephalus* и ассоциированного с видами других родов, подтверждается высокими оценками вероятности. Большее сходство четырехрогвого керчака с *Megalocottus platycephalus*, чем с видами рода *Myoxocephalus*, обнаружено в результате сравнительного кариологического анализа. Их общие признаки: пара мелких метацентриков; одиночные ЯО-хромосомы сходной морфологии (с *Megalocottus p. platycephalus*); локализация у *M. quadricornis* и *Megalocottus p. taeniopterus* ЯО в субтелоцентриках сходных размеров; изменчивость числа блоков ЯО.

Сравнительный анализ полученных молекулярно-генетических данных и результатов аналогичных исследований показывает определенное сходство положения *M. quadricornis*. В работе Kontula, Väinölä (2003) комплекс *M. quadricornis* находится внутри клады рода *Myoxocephalus* [9]. По мнению авторов, признание валидности рода *Triglopsis* сделало бы остальных *Myoxocephalus* парафилетической группой. Исследование Кнопе (2013) показало, что *Triglopsis quadricornis* и *Megalocottus platycephalus* объединяются в общую кладу [37]. Вместе с *Myoxocephalus scorpioides* и *Microcottus sellaris* они образуют отдельную группу, родственную с видами *Myoxocephalus*. Mecklenburg с соавт. (2016) определяют *M. quadricornis* и *Megalocottus platycephalus* как сестринские виды, находящиеся в кладе рода *Myoxocephalus* [3]. Генетические дистанции между *M. quadricornis* и видами *Myoxocephalus* (5.1—9.2%) совпадают с различиями в пределах рода *Myoxocephalus* (2.1—10.5%), что, по мнению авторов, не подтверждает существования рода *Triglopsis*. Однако авторы не обсуждают загадочное положение одного рода в кладе другого и не проводят сравнительный анализ дистанций между близкими родами семейства Cottidae. Все приведенные выше молекулярно-генетические результаты определенно свидетельствуют о близком родстве *M. quadricornis* с *Megalocottus platycephalus*, но не с видами рода *Myoxocephalus*, и следовательно о необходимости пересмотра таксономического статуса четырехрогвого керчака.

Таким образом, сравнительный кариологический анализ *M. quadricornis* показал, что хромосомные наборы этого вида и керчаков трибы *Myoxocephalini* имеют общие признаки, доказывающие их родство. Наибольшее число общих признаков кариотипов обнаружено у *M. quadricornis* и *Megalocottus platycephalus*, что подтверждает их более зна-

Таблица 2. Значения ML-дистанций (в %) для объединенных последовательностей генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК мтДНК *Myoxocephalus quadricornis*, видов трибы *Myoxocephalini* и внешней группы

Вид	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1. <i>Myoxocephalus quadricornis</i> (2079)																				
2. <i>M. quadricornis</i> (2167)	0.22																			
3. <i>M. quadricornis</i> (2308)	0.31	0.26																		
4. <i>M. quadricornis</i> (2309)	0.09	0.13	0.22																	
5. <i>M. quadricornis</i> (2310)	0.22	0	0.26	0.13																
6. <i>M. quadricornis</i> (2311)	0.31	0.26	0.17	0.22	0.26															
7. <i>M. quadricornis</i> (2260)	0.70	0.65	0.74	0.61	0.65	0.74														
8. <i>M. quadricornis</i> (2271)	0.78	0.74	0.83	0.70	0.74	0.83	0.09													
9. <i>M. quadricornis</i> (2274)	0.70	0.65	0.74	0.61	0.65	0.74	0.26	0.35												
10. <i>M. scorpius</i> (2273)	7.15	7.11	7.28	7.15	7.11	7.28	7.11	7.11	7.19											
11. <i>M. stelleri</i> (1754)	6.97	6.93	7.02	6.97	6.93	7.02	7.02	7.11	7.02	3.36										
12. <i>M. jaok</i> (1772)	7.15	7.11	7.19	7.15	7.11	7.19	7.24	7.32	7.24	3.79	1.79									
13. <i>M. polyacanthocephalus</i> (1745)	6.97	6.93	7.02	6.97	6.93	7.02	6.93	7.02	7.02	3.71	1.53	2.05								
14. <i>M. ochotensis</i> (1900)	6.97	6.93	7.02	6.97	6.93	7.02	6.93	7.02	6.93	3.49	1.74	2.44	2.31							
15. <i>M. brandtii</i> (1988)	7.45	7.41	7.50	7.45	7.41	7.50	7.45	7.54	7.54	3.97	2.44	2.66	2.62	2.57						
16. <i>Megalocottus platycephalus</i> (1790)	2.75	2.79	2.88	2.75	2.79	2.88	2.79	2.88	2.79	7.24	7.19	7.32	7.02	7.19	7.50					
17. <i>Microcottus sellaris</i> (2157)	7.19	7.06	7.24	7.11	7.06	7.24	7.28	7.37	7.19	8.81	8.24	8.89	8.46	8.33	8.81	7.11				
18. <i>Porocottus minutus</i> (1934)	8.50	8.37	8.54	8.50	8.37	8.46	8.63	8.72	8.59	7.72	7.19	7.41	7.24	7.28	7.32	9.37	8.98			
19. <i>Argyrocottus zanderi</i> (1734)	8.98	8.85	9.02	8.89	8.85	8.94	8.81	8.89	8.85	8.59	8.41	8.41	8.41	8.24	8.24	9.68	8.89	9.24		
20. <i>Aleichthyus elongatus</i> (2000)	12.77	12.64	12.77	12.69	12.64	12.77	12.60	12.69	12.47	13.12	13.08	13.21	12.95	13.21	12.90	13.51	12.60	12.82	13.12	

4. McAllister D.E. Atlas of North American Freshwater Fishes, Queen's Printer. Onawa, Canada, 1978. 826 p.
5. Dickman M. An isolated population of fourhorn sculpins (*Myoxocephalus quadricornis*, family Cottidae) in a hypersaline high arctic Canadian lake // *Hydrobiologia*. 1995. V. 12. P. 27–35.
6. Неелов А.В. Рыбы Чаунской губы Восточно-Сибирского моря // *Арктика и Антарктика*. М.: Наука, 2008. С. 154–184.
7. Kottelat M., Freyhof J. Handbook of European Freshwater Fishes. Publ. Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin, 2007. 646 p.
8. Dadswell M.J. Post-glacial dispersal of four freshwater fishes on the basis of new distribution records from eastern Ontario and western Quebec // *J. Fish. Res. Board Can.* 1972. V. 29. P. 545–553.
9. Kontula T., Väinölä R. Relationships of Palearctic and Nearctic 'glacial relict' *Myoxocephalus* sculpins from mitochondrial DNA data // *Mol. Ecol.* 2003. V. 12. P. 3179–3184.
10. Sheldon T.A., Mandrak N.E., Lovejoy N.R. Biogeography of the deepwater sculpin (*Myoxocephalus thompsonii*), a Nearctic glacial relict // *Can. J. Zool.* 2008. № 86. P. 108–115.
11. Scott W.B., Crossman E.J. The freshwater fishes of Canada // *Bull. Fish. Res. Board Can.* 1973. № 184. P. 842–848.
12. McAllister D.E., Aniskowicz J. Vertebral number in North American sculpins of the *Myoxocephalus quadricornis* – complex // *J. Fish. Res. Board Can.* 1976. V. 33. P. 2792–2799.
13. Morrow J.E. The Freshwater Fishes of Alaska. Alaska Northwest Publishing Alaska: Company: Anchorage, 1980. 248 p.
14. Fallis B.W., Harbicht S.M., MacKenzie B.J. A Preliminary Study of the Limnology and Biology of Garrow Lake, Northwest Territories, an Arctic Meromictic Lake. Department of Fisheries and Oceans: Winnipeg, MB, 1987. 55 p.
15. Mecklenburg C.W., Möller P.R., Steinke D. Biodiversity of Arctic marine fishes: taxonomy and zoogeography // *Mar. Biodivers.* 2011. V. 41. P. 109–140.
16. Радченко О.А., Морева И.Н., Петровская А.В. Кариологическая и молекулярно-генетическая дивергенция керчаков рода *Myoxocephalus* Gill, 1859 (Cottidae) // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 10. С. 1171–1183.
17. Balakirev E.S., Kravchenko A.Yu., Semenchenko A.A. Genetic evidence for a mixed composition of the genus *Myoxocephalus* (Cottoidei: Cottidae) necessitates generic realignment // *Genes*. 2020. V. 11. P. 1071. <https://doi.org/10.3390/genes11091071>
18. Fricke R., Eschmeyer W.N., van der Laan R. (eds) Eschmeyer's catalog of fishes: Genera, species, references. 2022. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed March 01, 2022.
19. Kligerman A.D., Bloom S.E. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes // *J. Fish. Res. Board Can.* 1977. V. 34. P. 266–269.
20. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method // *Experientia*. 1980. V. 36. P. 1014–1015.
21. Levan A., Fredga K., Sandberg A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // *Hereditas*. 1964. V. 52. P. 201–220.
22. Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука, 1985. 299 с.
23. Морева И.Н., Борисенко С.А. Кариотип северной дальневосточной широколобки *Megalocottus platycephalus platycephalus* (Pallas, 1814) (Pisces: Cottidae) из залива Одян Охотского моря // *Биология моря*. 2014. Т. 40. № 2. С. 137–142.
24. Морева И.Н., Борисенко С.А. Кариотип южной дальневосточной широколобки *Megalocottus platycephalus taeniopterus* (Kner, 1868) (Pisces: Cottidae) из залива восток Японского моря // *Биология моря*. 2015. Т. 41. № 6. С. 425–429.
25. Морева И.Н., Борисенко С.А. Кариотип многоиллого керчака *Myoxocephalus polyacanthocephalus* (Pallas, 1814) (Pisces: Cottidae) из российской части арела // *Биология моря*. 2017. Т. 43. № 1. С. 64–69.
26. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1982. 480 p.
27. Moreva I.N., Radchenko O.A., Petrovskaya A.V. Differentiation of the frog sculpin *Myoxocephalus stelleri* Tilesius, 1811 (Actinopterygii, Cottidae) based on mtDNA and karyotype analyses // *Comp. Cytogenet.* 2021. V. 15. № 2. P. 179–197. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v15.i2.63207>
28. 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. P. 539–542.
29. Rambaut A., Drummond A.J., Xie D. et al. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using tracer 1.7 // *Syst. Biol.* 2018. V. 67. P. 901–904.
30. Leache A.D., Reeder T.W. Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*): A comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches // *Syst. Biol.* 2002. V. 51. P. 44–68.
31. Кириллов А.Ф., Анполихова О.Д., Жирков Ф.Н. и др. Аннотированный список рыбообразных и рыб бассейна Восточно-Сибирского моря // *Исслед. водн. биол. ресурсов водоемов Камчатки и сев.-зап. части Тихого океана*. 2016. Вып. 42. С. 78–87.
32. Черешнев И.А., Кириллов А.Ф. Рыбообразные и рыбы морских и пресных вод бассейнов морей Лаптевых и Восточно-Сибирского // *Вестн. СВНЦ ДВО РАН*. 2007. № 2. С. 95–100.
33. Лайус Д.Л. Хромосомные наборы 13 видов рыб Белого моря // *Проблемы изучения, рационального использования, охраны природных ресурсов Белого моря. Регулярная конф. Тез. докл. Петрозаводск, 1992. С. 179–180.*
34. Arai R. Fish Karyotypes. A Check List. Tokyo; Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer, 2011. 347 p. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-53877-6>
35. Radchenko O.A., Moreva I.N., Petrovskaya A.V. The subfamily Myoxocephalinae of cottid fishes (Cottidae): Genetic divergence and phylogenetic relationships //

- J. Fish Biol. 2021. V. 99. P. 1857–1868.
<https://doi.org/10.1111/jfb.14886>
36. Богдацкая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М.: КМК, 2004. 389 с.
37. Knope M.L. Phylogenetics of the marine sculpins (Teleostei: Cottidae) of the North American Pacific Coast // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. V. 66. P. 341–349.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.10.008>
38. Page L.M., Espinoza-Perez H., Findley L.T. et al. Common and Scientific Names of Fishes from the United States, Canada, and Mexico, 7th ed. American Fisheries Society. Special Publ. 34. Bethesda, 2013. 243 p.
39. Goto A., Yokoyama R., Sideleva V.G. Evolutionary diversification in freshwater sculpins (Cottoidea): A review of two major adaptive radiations // Environ. Biol. Fish. 2014. V. 98. P. 307–335.
<https://doi.org/10.1007/s10641-014-0262-7>

Genetic Differentiation of the Fourhorn Sculpin *Myoxocephalus quadricornis* (Linnaeus, 1758) and Its Position in the Tribe Myoxocephalini Taranetz (Cottidae: Myoxocephalinae)

I. N. Moreva^{a, b, *}, O. A. Radchenko^b, and A. V. Petrovskaya^b

^aZhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

^bInstitute of Biological Problems of the North, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia

*e-mail: irruz@yandex.ru

A molecular genetic and karyological study of the fourhorn sculpin *Myoxocephalus quadricornis* (Linnaeus, 1758) was carried out. The karyotype was studied for the first time and the results of Ag-staining of the chromosomes of specimens of the species from the East Siberian Sea are presented. The karyotype of *M. quadricornis* is stable, contains 32 (10 metacentrics, 2 submetacentrics, 20 subtelocentrics) chromosomes, the number of chromosome arms is 44. Nucleolar organizers were found in the telomeric regions of the short arms of two homologous medium-sized subtelocentrics. Variability in the number of nucleolar-forming chromosomes and stained blocks of nucleolar organizers was found. Common features in the chromosome sets of *M. quadricornis* and *Megalocottus platycephalus* indicate their greater similarity compared to species of the genus *Myoxocephalus*. The results of the karyological analysis are consistent with the molecular genetic data about the sister relationships between *M. quadricornis* and *Megalocottus platycephalus*. A complex of karyological and molecular-genetic features has been identified that allow one to reliably distinguish *M. quadricornis* from species of the tribe Myoxocephalini and indicate the need for its removal from the genus *Myoxocephalus*.

Keywords: tribe Myoxocephalini, karyotype, marker chromosomes, nucleolar organizers (NOs), mitochondrial DNA, genetic differentiation.