

Молекулярная генетика

Рубрика

Научная статья /
Original research article

doi.org/10.31043/2410-2733-2025-4-5-13
УДК: 575.86

Д. К. Митрюшкина¹, М. Н. Киселева¹, О. В. Апаликова¹

ND5-ND6 митохондриальной ДНК как молекулярный маркер для дифференциации двух ремонтно-маточных стад нельмы «кубенская» и «обская»

¹ Санкт-Петербургский филиал ГНЦ ФГБНУ «ВНИРО» (ГосНИОРХ им. Л. С. Берга)

Рекомендации для цитирования:

Митрюшкина Д. К. ND5-ND6 митохондриальной ДНК как молекулярный маркер для дифференциации двух ремонтно-маточных стад нельмы «кубенская» и «обская» // Д. К. Митрюшкина, М. Н. Киселева, О. В. Апаликова // Генетика и разведение животных. — 2025. — № 4. — С. 5–13. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2025-4-5-13>

For citation:

Mitryushkina D. ND5-ND6 of mitochondrial dna as a molecular marker for differentiations of two repair and uterine nelm herds "Kubenskaya" and "Obskaya" // D. Mitryushkina, M. Kiseleva, O. Apalikova // Genetics and animal breeding. — 2025. — №. 4. — P. 5–13. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2025-4-5-13>

Поступила в редакцию: 09.08.2025.

Received: 09.08.2025.

© Mitryushkina D., Kiseleva M., Apalikova O., 2025

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest: the authors declare that they have no conflict of interest.

Введение. Особенности эволюционной истории представителей семейства *Coregonidae* до настоящего времени обуславливают актуальность исследований их филогенетических взаимосвязей [1–9].

Благодаря особенностям морфологии и образу жизни типичных хищных рыб род *Stenodus* (Richardson, 1836) был определен как наиболее удаленный таксон среди сиговых рыб [10]. При этом многие авторы [11–16] рассматривают роды *Stenodus* и *Coregonus* (Linnaeus, 1758) как

Аннотация.

Цель работы состояла в оценке возможности применения участка ND5/ND6 мтДНК в качестве полиморфного маркера для дифференциации нельмы на примере двух ремонтно-маточных стад нельмы «Кубенская» и нельмы «Обская» рыбоводного хозяйства «Форват» Ленинградской области.

Материалы и методы. Материалом для исследования нельмы послужили 60 образцов тканей сеголеток нельмы, собранные в период 2020–2023 гг. на рыбоводном хозяйстве из ремонтно-маточного стада «Кубенская нельма» (n=30) и «Обская нельма» (n=30). Гаплотипирование нельмы проводили по участку ND5/ND6 мтДНК методом ПЦР-ПДРФ на основе полиморфизма сайтов рестрикции эндонуклеазных ферментов и определяли нуклеотидные последовательности секвенированием по Сэнгеру этого участка мтДНК. Данные о нуклеотидной последовательности ND5/ND6 у образцов нельмы из двух выборок получены с помощью генетического анализатора ABI-3500 (Applied Biosystems), последовательности ДНК были отредактированы вручную и выровнены с помощью программного обеспечения MEGA X.

Результаты. Представленные в работе особенности нуклеотидной последовательности ND5/ND6 у представителей рода *Stenodus* ранее не рассматривались как информативный молекулярно-генетический маркер. Было установлено, что нельма из ремонтно-маточного стада, сформированного от производителей озера Кубенского, демонстрирует генетические отличия от ремонтно-маточного стада нельмы из р. Оби. Проанализированный участок мтДНК может быть применен в качестве молекулярно-генетического маркера при проведении гаплотипирования нельмы на рыбоводных предприятиях в выборках значительного объема для контроля мероприятий по восстановлению географически удаленных природных популяций нельмы.

Ключевые слова: сиговые рыбы; биоразнообразие; искусственное воспроизводство; изменчивость митохондриальной ДНК.

филогенетически близкие сестринские таксоны.

Исследование молекулярно-генетических характеристик нельмы и белорыбицы в большинстве случаев являлось частью более широких филогенетических исследований [17; 18]. Однако анализу внутривидовых филогенетических связей посвящено совсем небольшое количество работ [19–21], поэтому, в частности, вопрос о таксономическом статусе белорыбицы *Stenodus leucichthys leucichthys* (Güldenstädt, 1772) и

Stenodus leucichthys nelma (Pallas, 1773) в составе рода *Stenodus* до настоящего времени остается открытым. Так, аллозимный анализ для оценки дифференциации белорыбицы из бассейна Каспийского моря и северной нельмы не выявил выраженных различий, что, по мнению Головановой с соавторами, свидетельствовало об их подвидовом статусе [19]. Но, по мнению некоторых исследователей, каспийскую белорыбицу и нельму следует считать отдельными видами *Stenodus leucichthys* и *Stenodus nelma* [22].

Нельма, как циркумполярный подвид, распространена в северных широтах Евразии [23]. Исследования современного состояния её популяционно-генетической структуры немногочисленны и направлены, главным образом, на популяции нельмы в Сибири [24–26]. В настоящее время нельма и белорыбица имеют статус объектов, находящихся под угрозой исчезновения [27], что обуславливает расширение мероприятий по их искусственному воспроизводству.

Согласно выводам Головановой, «в связи со снижением численности популяций нельмы и важностью определения оптимальных вариантов по стандарту выпускаемой молоди необходим генетический мониторинг природных популяций», а «для получения высококачественного рыбопосадочного материала в целях воспроизводства белорыбицы и нельмы необходим постоянный генетический мониторинг маточных стад» [21].

На сегодняшний день нельма в европейской части России находится под угрозой исчезновения. Несколько популяций, включая нельму Кубенского озера, занесены в Красную книгу РФ с высшим статусом угрозы (I категория) [27]. Еще в 50-х годах прошлого века в Кубенском озере нельма имела высокие показатели численности. Так, в 1953 году максимальный улов составлял 62 тонны [28; 29]. Однако уже в 1994–1995 годах в Кубенском озере было отловлено лишь около 100 половозрелых особей нельмы [27]. В настоящее время нельма активно воспроизводится на рыбоводных заводах, где созданы ремонтно-маточные стада [30].

На разработку молекулярных маркеров для генетического мониторинга процесса воспроизвод-

ства нельмы направлено представленное исследование. Предпринята попытка оценить возможность применения участка *ND5/6* митохондриального генома в качестве молекулярно-генетического маркера для дифференциации двух ремонтно-маточных стад нельмы.

Цель исследований — оценка возможности применения участка *ND5/ND6* мтДНК в качестве полиморфного маркера для дифференциации нельмы на примере двух ремонтно-маточных стад нельма «Кубенская» и нельма «Обская» рыбоводного хозяйства «Форват» Ленинградской области.

Материалы и методы. Материалом для исследования нельмы послужили 60 образцов тканей сеголеток нельмы, собранные в период 2020–2023 гг. на рыбоводном хозяйстве «Форват» (ООО «Форват. Центр технологий разведения сиговых рыб. Сиговый питомник») из ремонтно-маточного стада (РМС) «Кубенская нельма» (n=30) и РМС «Обская нельма» (n=30).

Подготовка проб ДНК

Экстракция тотальной ДНК и ее очистка из зафиксированных в 95 % этаноле проб проведены солевым методом [31].

Полимеразная цепная реакция

Участок мтДНК *ND5/ND6*, кодирующий пятую и шестую субъединицы фермента NADH-дегидрогеназы, был амплифицирован с использованием праймеров *AJG 11* и *AJG 16*, разработанных ранее для амплификации отдельных участков мтДНК лососевых рыб [32]. Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере Biorad T100 MyCycler в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 е.а Taq ДНК-полимеразы, 2,5 мкл 10 ЧТaq-буфера (Диалат), 1 mM каждого dNTP, 0,25 мкМ каждого праймера и около 30 нг тотальной ДНК. Программа ПЦР включала этапы: предварительная денатурация 95 °C — 5 минут, [денатурация цепей 95 °C (30 сек), отжиг праймеров — 55 °C (30 сек), элонгация 72 °C (2 мин 30 сек)] — 34 цикла и заключительный цикл элонгации 72 °C — 5 мин, далее 12 °C — ∞. Размер амплифицированного участка *ND5/ND6* мтДНК [33] нельмы составил около 2400 пар нуклеотидов.

Таблица 1. Праймеры, использованные в исследовании
Table 1. Primers used in the study

Название	Последовательность
AJG11	5' – AACAGCTCATCCATTGGTCTTAGG – 3'
ND5-6/600dir	5' – TGAGAAATTCAACAAAT – 3'
ND5-6/1200dir	5' – СТАТТАТТГААГССТТААА – 3'
ND5-6/1760dir	5' – GCAAGCCAAATGGTAGATCA – 3'
AJG16	5' – TTACAACGATGGTTTTTCATGTCA – 3'

Подбор ферментов для проведения рестрикции

Перед исследованием генетического разнообразия отобранных экземпляров нельмы был проведен анализ единственного митохондриального генома *Stenodus leucichthys* (GenBank ID: NC_020761.1). Для поиска полиморфизма в *ND5/ND6* мтДНК с использованием интернет-сервиса NEBcutter в online-режиме была подобрана группа из 13 ферментов с 2-5 сайтами рестрикции в идентичной области эталонной мтДНК (NC_020761.1) и были составлены карты сайтов рестрикции *in silico* к ферментам [34].

Реакции эндонуклеазного гидролиза амплифицированного участка мтДНК были проведены тринадцатью ферментами: Bme18I, Bsp1286I, BsrI, DraI, FokI, HinfI, DpnII (MboI), MspI, MvaI (BstNI), NciI, PleI, RsaI, Sau96I, в условиях, указанных производителем (Сибэнзим).

Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза проводили в 2 % агарозном геле. Фрагменты ДНК в геле окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. В качестве маркера длины нуклеотидного фрагмента использовали маркер производства Сибэнзим (100 bp+1,5Kb+3Kb).

Различия в электрофоретических спектрах продуктов ферментного гидролиза показаны в результатах. Всем вариантам полученных спектров присвоены буквенные обозначения (А, В и т. д.). После гаплотипирования исследованных экземпляров рыб для дальнейшего секвенирования было отобрано по несколько проб с разными комплексными гаплотипами, установленными по различиям в электрофоретических спектрах продуктов рестрикции.

Секвенирование по Сэнгеру

Секвенальную реакцию проводили в амплификаторе Biorad T100 MyCycler в 10 мкл реакционной смеси, с использованием реагентов коммерческого набора GenSeq в соответствии с рекомендациями производителя (Синтол). Программа включала в себя следующие этапы: начальная денатурация 96°C — 30 сек, [денатурация 96°C (10 сек), отжиг праймера 50°C (5 сек), элонгация 60°C (4 мин)] 35 циклов, хранение 4°C — ∞. Для секвенальных реакций, помимо праймеров AJG 11 и AJG 16, были использованы дополнительные праймеры (табл. 1).

Данные о нуклеотидной последовательности *ND5/ND6* у образцов нельмы из двух выборок получены с помощью генетического анализатора ABI-3500 (Applied Biosystems), последовательности ДНК были отредактированы вручную и выровнены с помощью программного обеспечения MEGA X.

Результаты и обсуждение. На основе данных изменчивости в нуклеотидной последовательности участка *ND5/ND6* митохондриального генома было проведено гаплотипирование индивидуальных проб нельмы. Размеры фрагментов эндонуклеазного гидролиза представлены в таблице 2. Точные размеры рестрикционных фрагментов определены на основе данных секвенирования репрезентативных образцов. Небольшие фрагменты (<80 п.о.) не визуализированы на электрофореграммах, но рассчитаны исходя из известной последовательности NC_020761.1 *in silico*.

Между двумя группами проб нельмы в спектрах продуктов эндонуклеазного гидролиза

Таблица 2. Размеры фрагментов рестрикции набором ферментов-рестриктаз целевого участка мтДНК *ND5/ND6*

Table 2. Sizes of restriction fragments of the target region of mtDNA *ND5/ND6* by a set of restriction enzymes

<i>Bme</i> 181	<i>Bsp</i> 1286I	<i>Bsr</i> I		<i>Dra</i> I	<i>Fok</i> I	<i>Hinf</i> I		<i>Dpn</i> II		<i>Msp</i> I		<i>Mva</i> I		<i>Nci</i> I	<i>Ple</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 96I
A	A	A	B	A	A	A	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	
971	753	1095		1333	471	690	690	1334	1067	1067		864	1192	1081	1187	870	
733	535		830	654	461	542		424	644		780	780	1066	550	490	733	
450	503	577	577	369	449	378	378	262	417	417	776		98	247	473	450	
202	377	470	470		368		362	253		382	405	405		247	161	145	
	111		264		231	261	261	42		262	148	148		231	45	101	
	77	214	214		229	245	245	41	130	130	122	122				56	
					147	240	240		98	98	89					1	
							180				36	36					

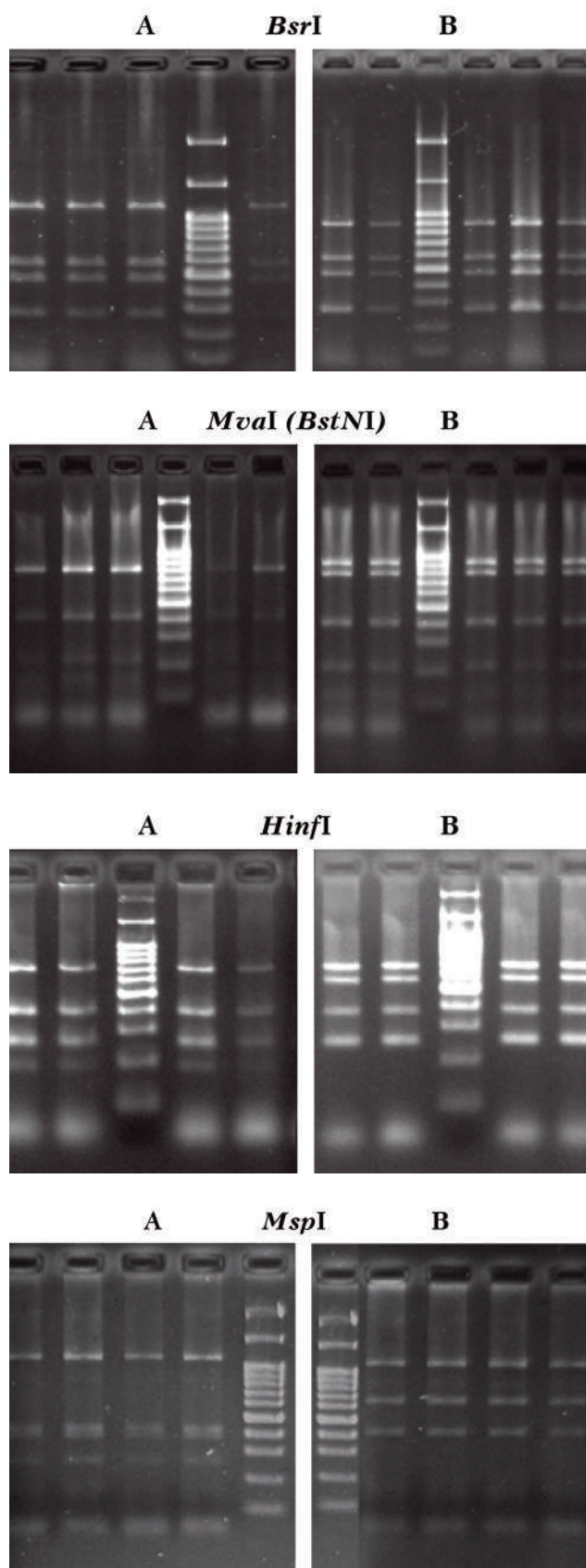


Рис. 1. Электрофоретические спектры продуктов рестрикции участка мтДНК ND5-ND6 нельмы. А и В – буквенные обозначения гаплотипов по единичным рестриктазам. Примечание. Состав маркера указан в разделе «Материал и методы»

Fig. 1. Electrophoretic spectra of restriction products of the ND5-ND6 mtDNA region of nelma. A and B are the letter designations of haplotypes for single restriction enzymes. Note: The marker composition is specified in the Materials and Methods section.

ND5/ND6 несколькими рестрицирующими ферментами на электрофореграммах проявились различия (рис. 1).

Ферменты BsrI, HinfI, MspI и MvaI выявили дифференциацию кубенской и обской выборки нельмы из соответствующих РМС. На основе изменчивости в сайтах рестрикции использованных в анализе ферментов составлены комплексные гаплотипы (табл. 3).

Метод ПЦР-ПДРФ позволил выявить в нуклеотидной последовательности ND5/ND6 длиной около 2400 п.н. 3 изменчивых позиции, дифференцирующих РМС нельмы «Кубенской» и «Обской», среди 58 сайтов рестрикции использованных нами тринадцати ферментов (рис. 2). Причем ферментами рестрикции HinfI и MspI была подтверждена изменчивость двух соседних нуклеотидов в 262 и 363 позиции в последовательности ND5-ND6.

Полученные данные секвенирования этого же участка мтДНК (2356 п.н.) показали наличие 9 полиморфизмов, то есть разрешающая способность метода ПЦР-ПДРФ для скрининга гаплотипов в выборках составила 1/3 по отношению к полному определению нуклеотидной последовательности ND5/ND6. Доля нуклеотидных замен между двумя выявленными гаплотипами нельмы составила около 0,005 % («кубенская» и «обская»).

Полученные нами данные согласуются с выводами Головановой с соавторами об отсутствии выраженных различий при оценке дифференциации белорыбицы из бассейна Каспийского моря и северной нельмы на основе данных аллозимного анализа [19].

Отсутствие полиморфизма в популяции нельмы озера Кубенского в участке ND5/ND6 мтДНК, вероятно, является следствием крайне ограниченного числа производителей, участвовавших в формировании ремонтно-маточного стада для искусственного воспроизводства. На снижение гаплотипического разнообразия нельмы также могла повлиять зарегулированность впадающих в озеро водотоков. Известно, что современная жилая форма нельмы образовалась в озере после строительства плотины на реке Сухоне в 1834 году, вследствие чего миграционные пути нельмы в бассейн Северной Двины оказались перекрыты [28].

Таким образом, полученные данные позволяют отличать кубенскую нельму от других популяций вида *Stenodus leucichthys* по уникальным марке-

Таблица 3. Список комплексных гаплотипов исследованной нельмы и эталонного образца *Stenodus leucichthys* из GenbankTable 3. List of complex haplotypes of the studied nelma and the reference sample of *Stenodus leucichthys* from GenBank

Комплексный гаплотип	<i>Bme18I</i>	<i>Bsp1286I</i>	<i>BsrI</i>	<i>DraI</i>	<i>FokI</i>	<i>HinfI</i>	<i>DpnII</i>	<i>MspI</i>	<i>MvaI</i>	<i>NciI</i>	<i>PleI</i>	<i>RsaI</i>	<i>Sau96I</i>
NC_020761.1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
OS11	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A
KS11	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A

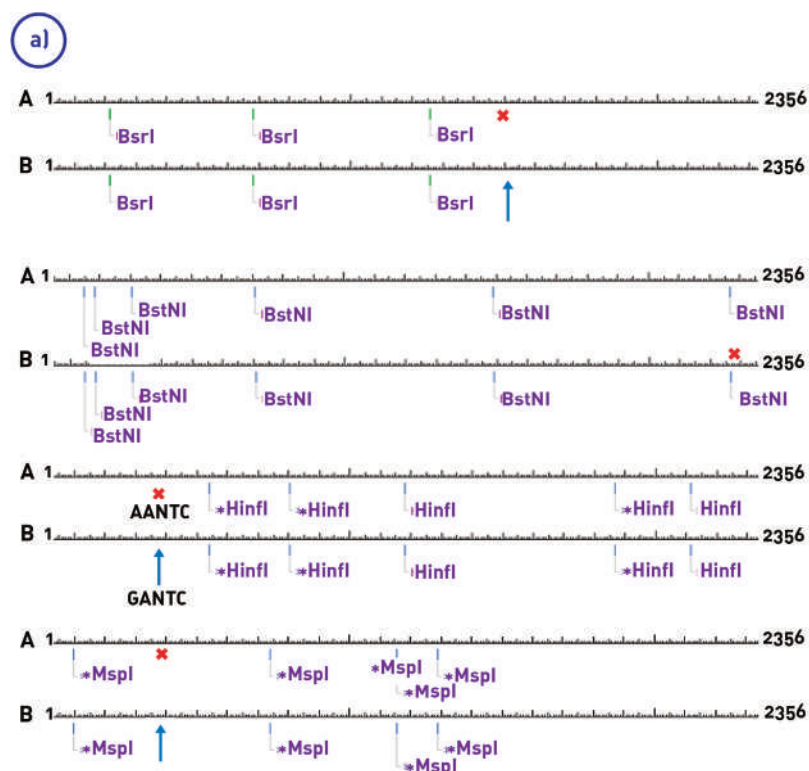
рам — полиморфным сайтам к рестрицирующим ферментам *BsrI*, *HinfI*, *MspI* и *MvaI* в нуклеотидной последовательности *ND5/ND6* мтДНК.

Заключение. Условия обитания нельмы в бассейне р. Оби и Кубенском озере в Европейской части России различны, свободному обмену генами между этими популяциями препятствуют огромные расстояния и Уральские горы. Изучение филогенетических взаимосвязей нельмы в различных зонах её ареала играет заметную роль в систематизации молекулярно-генетических характеристик локальных популяций нельмы, что, в свою очередь, дает ценную информацию при разработке мер искусственного воспроизводства.

Для сохранения этого ценного промыслового

вида, входящего в сложную экологическую сеть межвидовых взаимоотношений в естественных водоемах, принимаются меры по ее искусственному воспроизводству на рыбоводных предприятиях с последующим выпуском в природные водоемы. Чтобы восполнить численность нельмы, как ценного объекта промысла, необходимо более глубокое изучение ее внутривидовых и межпопуляционных генетических связей.

Полученные на основе полиморфизма участка *ND5/ND6* мтДНК данные о гаплотипических различиях особей из РМС «Кубенская нельма» и «Обская нельма» рыбоводного хозяйства «Форват» могут найти применение при проведении мероприятий по искусственному воспроизводству нельмы и других представителей рода *Stenodus*. Наши рекомендации представляют практическую ценность именно для данной узкой цели. Это не универсальный «тест на определение видовой принадлежности», а специализированный инструмент для охраны конкретной популяции.



6)

позиция	1	1	1	1	2	2	2	2
нуклеотид	3	3	6	8	9	4	5	6
ной замены	7	0	0	2	3	6	8	9
	2	3	8	1	5	3	4	3
	1	4	4	5	6			

NC 020761.1	A	A	T	T	C	C	A	A	G	C	G	G	G
SL3	G	.	.	C	.	.	G	.	T	.	C	.	.
OS11	G	.	.	C	.	.	G	.	T	.	C	.	.
KS11	G	G	A	C	T	T	G	G	A	T	A	.	G

Рис. 2. Локализация изменчивости в нуклеотидной последовательности *ND5/ND6* мтДНК нельмы: а) карты сайтов рестрикции ферментами, выявившими полиморфизм; б) положение нуклеотидных замен, определенных секвенированием по Сэнгеру.

Fig. 2. Localization of variability in the nucleotide sequence of *ND5/ND6* mtDNA of nelma: a) maps of restriction sites by enzymes that revealed polymorphism; b) position of nucleotide substitutions determined by Sanger sequencing.

Благодарим коллег лаборатории аввакультуры Санкт-Петербургского филиала ГНЦ ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга) и сотрудников ООО «Форват. Центр технологий разведения сиговых рыб. Сиговый питомник» за всемерную помощь в сборе проб тканей нельмы из аквакультурных стад. Приносим благодарность ведущему научному сотруднику лаборатории генетики Санкт-Петербургского филиала ГНЦ ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им. Л. С. Берга) Голотину В. А. за разработку дополнительных праймеров для проведения секвенальной реакции.

Исследование проведено на средства, выделенные для выполнения работ в соответствии с государственным заданием № 076-00004-23-01.

Литература

- Дрягин П. А. Вопросы филогении сиговых (*Coregonidae*) / П. А. Дрягин, П. Л. Пирожников, В. В. Покровский // Восьмая сессия ученого совета СевНИОРХ. Петрозаводск. — 1969. — С. 90–92.
- Решетников Ю. С. Экология и систематика сиговых рыб // М.: Наука. — 1980. — 263 с.
- Bernatchez L. Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: whitefish, *Coregonus* sp., as a case study / L. Bernatchez, A. Chouinard, G. Lu // Biol. J. Linn. Soc. — 1999. — V. 68. — P. 173–194.
- Sendek D. S. Electrophoretic studies of Coregonid fishes from across Russia / D. S. Sendek // Advances in Limnology. — 2002. — Vol. 57. — P. 35–55.
- Попов И. Ю. Квинтессенция эволюции / Попов И. Ю., Сендек Д. С. // Эволюционная биология: история и теория. — СПб: СПбФНБЕЕТ. — 2003. — С. 172–189.
- Politov D. V. Molecular phylogeography of Palearctic and Nearctic ciscoes. / D. V. Politov, J. W. Bickham, J. C. Patton // Annales Zoologici Fennici. — 2004 — Vol. 41. — P. 13–23.
- Боровикова Е. А. Систематическое положение и происхождение сигов (*Coregonus*, *Coregonidae*, *Osteichthyes*) Европы. Генетический подход / Е. А. Боровикова, А. А. Махров // Успехи совр. биологии. — 2009. — Т. 129. — № 1. — С. 58–66.
- Боровикова Е. А. Молекулярно-генетические исследования в решении проблем филогении и филогеографии сиговых рыб (*Coregonidae*) / Е. А. Боровикова // Труды Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН. — 2016. — № 73(76). — С. 46–63.
- Бочкарев Н. А. Таксономический статус и происхождение некоторых экологических форм сигов вида *Coregonus lavaretus* (L.) из водоемов Сибири / Н. А. Бочкарев, Е. И. Зуйкова, Д. В. Политов // Генетика. — 2017 — Т. 53. — № 8. — С. 922–932. doi: 10.7868/S0016675817080033.
- Берг Л. С. Пресноводные рыбы СССР и прилегающих стран. Часть 1. Издательство Академии наук СССР, Москва-Ленинград, 1948. — с. 466.
- Bernatchez L. Phylogenetic relationships among the subfamily Coregoninae as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis. / L. Bernatchez, F. Colombani, J. J. Dodson // Journal of Fish Biology. — 1991. — Vol. 39. — P. 283–290.
- Bodaly R. A. Genetic comparisons of New and Old World coregonid fishes. / R. A. Bodaly, J. Vuorinen et al. // Journal of Fish Biology. — 1991. — Vol. 38. — P. 37–51.
- Lockwood S. F. Phylogenetic relationships among members of the Coregoninae inferred from direct sequencing of PCR-amplified mitochondrial DNA. / S. F. Lockwood, R. E. Dillinger et al. // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. — 1993. — Vol. 50 — P. 2112–2118.
- Sajdak S. L. Phylogenetic relationships among *Coregonus* species inferred from the DNA sequence of the first internal transcribed spacer (*ITS1*) of ribosomal DNA / S. L. Sajdak, R. B. Phillips // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. — 1997. — Vol. 54. — P. 1494–1503.
- Reist J. D. The phylogeny of New- and Old World coregonine fishes as revealed by sequence variation in a portion of the d-loop of mitochondrial DNA / J. D. Reist, L. D. Maiers et al. // Biology and Management of Coregonid Fishes. — Advances in Limnology. — 1998 — Vol. 50. — P. 323–339.
- Baldina S. N. Genetic relationships of the Ussuri cisco, *Coregonus ussuriensis* Berg 1906, in view of mtDNA data / S. N. Baldina, N. Y. Gordon, D. V. Politov // Biology and Management of Coregonid Fishes. Advances in Limnology. — 2007. — Vol. 60 — P. 83–89.
- Crete-Lafreniere A. Framing the Salmonidae Family hylogenetic Portrait: A More Complete Picture from Increased taxon Sampling / A. Crete-Lafreniere, L. K. Weir, L. Bernatchez // PLoS ONE. — 2012. — 7(10). doi:10.1371/journal.pone.0046662.
- Politov D. V. Coregonids of Russia: Evolutionary genetic approach in assessment of the current state of biodiversity / D. V. Politov // Fundamental and Applied Limnology / Archiv for Hydrobiologie. — 2017. — Vol. 189(3). — P. 181–192. doi:10.1127/fal/2017/0814.
- Голованова Т. С. Аллозимная изменчивость белорыбицы и нельмы *Stenodus leucichthys* / Т.С. Голованова, Д.Г. Мальдов и др. // Вопросы рыболовства. — 2000. — Т. 1. — № 2. — С. 95–96.

20. Голованова Т. С. Применение RAPD-PCR-анализа для изучения внутривидовой изменчивости белорыбицы и нельмы (*Stenodus leucichthys*) / Т. С. Голованова, С. И. и др. // П Биология, биотехника разведения и промышленного выращивания сиговых рыб: Материалы научно-производственного совещания. Тюмень. — 2001. — С. 37–41.
21. Голованова Т. С. Анализ генетической изменчивости белорыбицы и нельмы *Stenodus leucichthys* (Guldenstadt, 1772) в связи с задачами искусственного воспроизводства // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М.: ВНИИПРХ, 2004 — 24 с.
22. Kottelat M., Freyhof J. Handbook of European freshwater fishes, 2007 — p. 640.
23. Шестаков А. В. Материалы по биологии нельмы (*Stenodus leucichthys nelma*) среднего течения реки Анадырь / А. В. Шестаков, С. И. Грунин // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. — 2005. — Вып. 3. — С. 552–556.
24. Попов П. А. Рыбы Сибири: распространение, экология, вылов: моногр. Новосибирск: Изд-во Новосибир. гос. ун-та, 2007 — 526 с.
25. Заделенов В. А. Нельма *Stenodus leucichthys nelma* (Pallas, 1773) (*Salmoniformes*, *Coregonidae*) реки Енисей: структура популяций, промысел, воспроизводство / В. А. Заделенов, Е. В. Дербинева // Вопр. Рыболовства. — 2020 — Т. 21. — № 2. — С. 156–168.
26. Бухардинова М. В. Распространение и миграционный цикл нельмы *Stenodus leucichthys nelma* (Pallas, 1773) / М. В. Бухардинова // Вестник Астраханского государственного технического университета. — 2022 — № 1. — Vol. 73. — С. 16–24.
27. Тихонов А. В. Животные России. Красная книга / М.: Росмэн, 2012 — 241 с.
28. Титенков И.С. Кубенская нельма / М.: Рыбное хозяйство, 1961 — 52 с.
29. Красная книга Российской Федерации. Животные / М.: АСТ Астрель, 2001 — 862 с.
30. Коновалов А. Ф. Опыт искусственного воспроизводства нельмы *Stenodus leucichthys nelma* в бассейне Кубенского озера / А. Ф. Коновалов, М. Я. Борисов, Н. В. Думнич // Вестн. рыбохозяйств. Науки. — 2016 — Т. 3. — № 4 (12). — С. 12–19.
31. Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques / S. M. Aljanabi, I. Martinez // Nucleic Acids Res. — 1997. — V. 25.
32. Gharrett A. J. Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA variation in Alaskan coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. / A. J. Gharrett, A. K. Gray, V. Brykov // Fishery Bulletin. — 2001 — Vol. 99(4). — P. 528–544.
33. Brown W. M. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA / W. M. Brown, M. George, A. C. Wilson // Ibid. 1979 — V. 76. — P. 1967–1971.
34. NEBcutter V2.0 2025. URL: <https://nc2.neb.com/NEBcutter2/?noredir> (дата обращения: 18.07.2025).

Mitryushkina D.¹, Kiseleva M.¹, Apalikova O.¹

ND5-ND6 of mitochondrial dna as a molecular marker for differentiations of two repair and uterine nelma herds "Kubenskaya" and "Obskaya"

¹ St. Petersburg branch of VNIRO [L. S. Berg «GosNIORKh»]

Abstract.

The **purpose** of the work is to evaluate the possibility of using the ND5/ND6 mtDNA site as a polymorphic marker for nelma differentiation using the example of two repair and brood herds of nelma "Kubenskaya" and "Obskaya" of the Forvat fish farm in the Leningrad region.

Materials and Methods. Nelma haplotyping by PCR-RDF based on polymorphism of restriction sites of endonuclease enzymes and determination of the nucleotide sequence by Sanger sequencing of the ND5/ND6 mtDNA region.

Results. The features of the ND5/ND6 nucleotide sequence presented in the work in representatives of the genus *Stenodus* had not previously been considered as an informative molecular genetic marker. It was found that the nelma from the repair and broodstock formed from the producers of Lake Kubensky demonstrates genetic differences from the repair and broodstock of the nelma from the Ob River. The analyzed mtDNA region can be used as a molecular genetic marker when carrying out nelma haplotyping at fish hatcheries in samples of a significant volume to control measures to restore geographically remote natural populations of nelma.

Key words: whitefish; biodiversity; artificial reproduction; variability of mitochondrial DNA.

References

1. Dryagin P. A. Questions of the phylogeny of whitefishes (*Coregonidae*) / P. A. Dryagin, P. L. Pirozhnikov, V. V. Pokrovsky // Eighth session of the Scientific Council of SevNIORH. Petrozavodsk. — 1969. — P. 90–92.
2. Reshetnikov Yu. S. Ecology and systematics of whitefish // M.: Nauka. — 1980. — 263 p.
3. Bernatchez L. Integrating molecular genetics and ecology in studies of adaptive radiation: whitefish, *Coregonus* sp., as a case study / L. Bernatchez, A. Chouinard, G. Lu // Biol. J. Linn. Soc. — 1999. — V. 68. — P. 173–194.
4. Sendek D. S. Electrophoretic studies of Coregonid fishes from across Russia / D. S. Sendek // Advances in Limnology. — 2002. — Vol. 57. — P. 35–55.
5. Popov I. Yu. The Quintessence of Evolution / Popov I. Yu., Sendek D. S. // Evolutionary Biology: History and Theory. St. Petersburg: SPbFIET. — 2003. — P. 172–189.
6. Politov D. V. Molecular phylogeography of Palearctic and Nearctic ciscoes. / D. V. Politov, J. W. Bickham, J. C. Patton // Annales Zoologici Fennici. — 2004 — Vol. 41. — P. 13–23.
7. Borovikova E. A. Systematic position and origin of whitefishes (*Coregonus*, *Coregonidae*, *Osteichthyes*) of Europe. Genetic approach / E. A. Borovikova, A. A. Makhrov // Advances in modern biology. — 2009. — Vol. 129. — № 1. — P. 58–66.
8. Borovikova E. A. Molecular genetic studies in solving problems of phylogeny and phylogeography of whitefishes (*Coregonidae*) / E. A. Borovikova // Transactions of the I. D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences. — 2016. — № 73 (76). — P. 46–63.
9. Bochkarev N. A. Taxonomic status and origin of some ecological forms of whitefish of the species *Coregonus lavaretus* (L.) from Siberian water bodies / N. A. Bochkarev, E. I. Zuikova, D. V. Politov // Genetics. — 2017. — Vol. 53. — № 8. — P. 922–932. doi: 10.7868/S0016675817080033.
10. Berg L. S. Freshwater fishes of the USSR and adjacent countries. Part 1. Publishing House of the USSR Academy of Sciences, Moscow-Leningrad, 1948. — p. 466.
11. Bernatchez L. Phylogenetic relationships among the subfamily Coregoninae as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis. / L. Bernatchez, F. Colombani, J. J. Dodson // Journal of Fish Biology. — 1991. — Vol. 39. — P. 283–290.
12. Bodaly R. A. Genetic comparisons of New and Old World coregonid fishes. / R. A. Bodaly, J. Vuorinen et al. // Journal of Fish Biology. — 1991. — Vol. 38. — P. 37–51.
13. Lockwood S. F. Phylogenetic relationships among members of the Coregoninae inferred from direct sequencing of PCR-amplified mitochondrial DNA. / S. F. Lockwood, R. E. Dillinger et al. // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. — 1993. — Vol. 50 — P. 2112–2118.
14. Sajdak S. L. Phylogenetic relationships among *Coregonus* species inferred from the DNA sequence of the first internal transcribed spacer (*ITS1*) of ribosomal DNA / S. L. Sajdak, R. B. Phillips // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. — 1997. — Vol. 54. — P. 1494–1503.
15. Reist J. D. The phylogeny of New- and Old World coregonine fishes as revealed by sequence variation in a portion of the d-loop of mitochondrial DNA / J. D. Reist, L. D. Maiers et al. // Biology and Management of Coregonid Fishes. — Advances in Limnology. — 1998 — Vol. 50. — P. 323–339.
16. Baldina S. N. Genetic relationships of the Ussuriscisco, *Coregonus ussuriensis* Berg 1906, in view of mtDNA data / S. N. Baldina, N. Y. Gordon, D. V. Politov // Biology and Management of Coregonid Fishes. Advances in Limnology. — 2007. — Vol. 60 — P. 83–89.
17. Crete-Lafreniere A. Framing the Salmonidae Family phylogenetic Portrait: A More Complete Picture from Increased taxon Sampling / A. Crete-Lafreniere, L. K. Weir, L. Bernatchez // PLoS ONE. — 2012. — 7(10).
18. Politov D. V. Coregonids of Russia: Evolutionary genetic approach in assessment of the current state of biodiversity / D. V. Politov // Fundamental and Applied Limnology / Archiv for Hydrobiologie. — 2017. — Vol. 189(3). — P. 181–192.
19. Golovanova T. S. Allozyme variability of whitefish and nelma *Stenodus leucichthys* / T. S. Golovanova, D. G. Maldov, et al. // Voprosy rybovodstva. — 2000. — Vol. 1. — № 2. — P. 95–96.
20. Golovanova T. S. Application of RAPD-PCR analysis to study intraspecific variability of whitefish and nelma (*Stenodus leucichthys*) / T. S. Golovanova, S. I., et al. // II Biology, bioengineering of breeding and industrial cultivation of whitefish: Proceedings of the scientific and production meeting. Tyumen. — 2001. — P. 37–41.
21. Golovanova T. S. Analysis of genetic variability of whitefish and nelma *Stenodus leucichthys* (Guldenstadt, 1772) in connection with the tasks of artificial reproduction // Abstract of Cand. Sci. (Biol.). Moscow: VNIIPRKh, 2004 — 24 p.
22. Kottelat M., Freyhof J. Handbook of European freshwater fishes, 2007 — p. 640.
23. Shestakov A. V. Materials on the biology of nelma (*Stenodus leucichthys nelma*) of the middle reaches of the Anadyr River / A. V. Shestakov, S. I. Grunin

- // Readings in memory of Vladimir Yakovlevich Levanidov. — 2005. — Issue 3. — P. 552–556.
24. Popov P. A. Fishes of Siberia: distribution, ecology, catch: monograph. Novosibirsk: Publishing house of Novosibirsk. state University, 2007. — 526 p.
 25. Zadelenov V. A. Nelma *Stenodus leucichthys nelma* (Pallas, 1773) (*Salmoniformes, Coregonidae*) of the Yenisei River: population structure, fishery, reproduction / V. A. Zadelenov, E. V. Derbineva // Vopr. Fisheries. — 2020. — Vol. 21. — № 2. — P. 156–168.
 26. Bukhardinova M. V. Distribution and migration cycle of nelma *Stenodus leucichthys nelma* (Pallas, 1773) / M. V. Bukhardinova // Bulletin of Astrakhan State Technical University. — 2022. — № 1. — Vol. 73. — P. 16–24.
 27. Tikhonov A. V. Animals of Russia. Red Book / Moscow: Rosman, 2012 — 241 p.
 28. Titenkov I. S. Kubenskaya nelma / Moscow: Fisheries, 1961. — 52 p.
 29. Red Data Book of the Russian Federation. Animals / Moscow: AST Astrel, 2001 — 862 p.
 30. Konovalov A. F. Experiment with artificial reproduction of nelma *Stenodus leucichthys nelma* in the Lake Kubenskoye basin / A. F. Konovalov, M. Ya. Borisov, N. V. Dumnich // Bulletin of fishery sciences. — 2016. — Vol. 3. — № 4 (12). — P. 12–19.
 31. Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques / S. M. Aljanabi, I. Martinez // Nucleic Acids Res. — 1997 — V. 25.
 32. Gharrett A. J. Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA variation in Alaskan coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. / A. J. Gharrett, A. K. Gray, V. Brykov // Fishery Bulletin. — 2001 — Vol. 99(4). — P. 528–544.
 33. Brown W. M. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA / W. M. Brown, M. George, A. C. Wilson // Ibid. 1979 — V. 76. — P. 1967–1971.
 34. NEBcutter V2.0 2025. URL: <https://nc2.neb.com/NEBcutter2/?noredir> (дата обращения: 18.07.2025).

Сведения об авторах:

Митрюшкина Диана Константиновна — аспирант, старший специалист лаборатории генетики; Санкт-Петербургский филиал ГНЦ ФГБНУ «ВНИРО» (ГосНИОРХ им. Л. С. Берга), г. Санкт-Петербург, набережная Макарова, 26, 199053, Россия; e-mail: diana5@yandex.ru.

Киселева Марина Николаевна — аспирант, старший специалист лаборатории генетики; Санкт-Петербургский филиал ГНЦ ФГБНУ «ВНИРО» (ГосНИОРХ им. Л. С. Берга), г. Санкт-Петербург, набережная Макарова, 26, 199053, Россия; e-mail: marina.marinakisel@yandex.ru.

Апаликова Ольга Владимировна — кандидат биологических наук, заведующая лаборатории генетики; Санкт-Петербургский филиал ГНЦ ФГБНУ «ВНИРО» (ГосНИОРХ им. Л. С. Берга), г. Санкт-Петербург, набережная Макарова, 26, 199053, Россия; e-mail: olga_apalikova@mail.ru.

Authors:

Mitryushkina Diana Konstantinovna — postgraduate student, senior specialist, genetics laboratory; St. Petersburg branch of the VNIRO (L. S. Berg State Research Institute of Lake and River Fisheries), St. Petersburg, Makarova Embankment, 26, 199053, Russia; e-mail: diana5@yandex.ru.

Kiseleva Marina Nikolaevna — postgraduate student, senior specialist, genetics laboratory; St. Petersburg branch of the VNIRO (L. S. Berg State Research Institute of Lake and River Fisheries), St. Petersburg, Makarova Embankment, 26, 199053, Russia; e-mail: marina.marinakisel@yandex.ru.

Apalikova Olga Vladimirovna — PhD (Biol. Sci.), head of the genetics laboratory; St. Petersburg branch of the State Research Center of the Federal State Budgetary Institution "VNIRO" (GosNIORH named after L. S. Berg), St. Petersburg, Makarova embankment, 26, 199053, Russia; e-mail: olga_apalikova@mail.ru.