

УДК 575.13:597.541

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ  
ДВУХ ВИДОВ ТЮЛЬКИ *CLUPEONELLA* KESSLER, 1877  
(ASTINOPTERYGII: CLUPEIDAE) ПОЗВОЛИЛ ПРОЯСНИТЬ  
ИХ ЭВОЛЮЦИОННУЮ ИСТОРИЮ В ПОНТО-КАСПИЙСКОМ РЕГИОНЕ<sup>1</sup>**

© 2025 г. Д. П. Карabanov\*<sup>@</sup>, Н. В. Козлова\*\*, Д. Д. Перебоев\*\*\*,  
Б. Д. Ефeyкин\*\*\*, А. А. Котов\*\*\*

\*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, ИБВВ РАН,  
109, Борок, 152742 Россия

\*\*Волжско-Каспийский филиал ГНЦ РФ ФГБНУ "ВНИРО" ("КаспНИРХ"), Савушкина, 1, Астрахань, 414056 Россия

\*\*\*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук,  
Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

<sup>@</sup>E-mail: dk@ibiw.ru

Поступила в редакцию 26.04.2024 г.

После доработки 27.06.2024 г.

Принята к публикации 28.06.2024 г.

В работе представлен сравнительный анализ аннотированного полного митохондриального генома анчоусовидной тюльки *Clupeonella engrauliformis* и черноморско-каспийской тюльки *C. cultriventris* из Каспийского моря. Митогеном тюлек имеет длину порядка 16.6 тыс. п.н. и характеризуется консервативным для сельдевых рыб расположением генов. Различия между митохондриальными геномами анчоусовидной и черноморско-каспийской тюлек из Каспийского моря составляет 449 п.н. (2.7%), в том числе 2 инсерции в контрольном регионе, неизвестных у других представителей рода *Clupeonella*. Дифференциация тюлек, вероятно, связана с трансгрессией и деградацией Понтического озера-моря: она началась в миоцене, продолжилась в плиоцене и завершилась уже к плейстоцену. Современные различия тюлек могут быть связаны с разными адаптациями их предков к специфическим условиям в разных водоемах — остатках Понтического "мега-озера".

**Ключевые слова:** геномика, митохондриальный геном, рыбы, тюлька, килька, *Clupeonella engrauliformis*, *Clupeonella cultriventris*, Каспийское море

**DOI:** 10.31857/S1026347025020032

Тюльки (кильки) рода *Clupeonella* Kessler, 1877 (*Clupeiformes*: *Clupeidae*) — мелкие пелагические стайные рыбы, обитающие только в Понто-Каспийском бассейне (Световидов, 1952). Всего в Каспийском море обитают три вида тюлек (Казанчев, 1981). Анчоусовидная тюлька (килька) *Clupeonella engrauliformis* (Borodin, 1904) — морской вид, обитает в не опресненных открытых районах Каспийского моря, в основном сосредоточена в области кругового течения. Черноморско-каспийская (обыкновенная) тюлька *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840), исторически обитавшая в опресненных участках и низовьях рек бассейна Черного, Азовского и Каспийского морей, в настоящее время значительно расширила ареал, расселившись по Днепру, Дону, Каме и по Волге

вплоть до 60° с.ш. (Karabanov *et al.*, 2023b). Большеглазая тюлька, *Clupeonella grimmi* Kessler, 1877 — исключительно морской вид, обитающий в основном в южной, реже в центральной части Каспийского моря, не подходит к берегам и никогда не встречается в зоне глубин менее 20 м. Во второй половине XX в. промысел трех обитающих в Каспии видов рода *Clupeonella* составлял более 80% от всего улова, при этом большая часть вылова приходилась на анчоусовидную тюльку и достигала более 400 тыс. т. в год (Daskalov, Mamedov, 2007). Основная масса рыб этого вида сосредоточена преимущественно в открытой части центральной и южной части Каспийского моря в пелагиали над глубинами от 50 м, что оптимально для промысла как с использованием рыбонасосов

<sup>1</sup>Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: DOI: 10.31857/S1026347025020032

и лова на свет, так и для традиционного тралового лова (Помогаева, Татарников, 2021).

Однако в результате совпадения нескольких факторов: многолетнего перелома, геологических изменений морского дна, вселения гребневика *Mnemiopsis leydii* Agassiz, 1865 (Tentaculata: Bolinopsidae), ставшего серьезнейшим трофическим конкурентом тюльки, – в начале 2000-х годов произошло резкое сокращение численности каспийских тюлек (UNEP, 2011). Это послужило причиной установить статус для анчоусовидной тюльки как вида, находящегося под угрозой исчезновения (Endangered under criteria A2bde) в “Красной книге Международного союза охраны природы” (Kauparagam *et al.*, 2018). В настоящее время хотя и прослеживается тренд на постепенное восстановление численности анчоусовидной тюльки (Разинков и др., 2020), но наблюдаются значительные межгодовые флуктуации и сохраняется высокая неопределенность прогноза динамики популяции и восстановления промысла этого вида.

Вместе с тем, несмотря на достаточно хорошую изученность биологических особенностей, данные по нуклеотидному разнообразию *C. engrauliformis* в общедоступных международных базах данных (GenBank, CNGB, EMBL-EBI, DDBJ, BoLD) отсутствуют. Помимо теоретического значения, например для целей восстановления филогении сельдевых рыб, достоверность видовой идентификации в данном случае важна и для организации рациональной эксплуатации биоресурсов. Хотя в структуре промыслового вылова тюльки обеспечиваются лишь 0.4% всей рыбной продукции внутренних водоемов мира, однако это составляет 11.5% от всех диадромных рыб (FAO yearbook, 2023).

В современных исследованиях биоразнообразия стандартом стал анализ вариаций последовательностей специфических митохондриальных маркеров (например, цитохром *c*-оксидазы I), который позволяет идентифицировать многоклеточных животных на основе ДНК. Вместе с тем отдельные гены часто не обладают достаточным уровнем нуклеотидной изменчивости, тогда как добавления разных митохондриальных маркеров, в том числе всего митогенома, позволяет получить наиболее адекватную топологию филогенетического дерева и оценки дат дивергенции (Duchene *et al.*, 2011).

Цель настоящей работы – провести секвенирование и аннотирование нуклеотидной последовательности полного митохондриального генома каспийской анчоусовидной тюльки *C. engrauliformis* и родственного вида, черноморско-каспийской тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840); произвести сравнение митогеномов анчоусовидной и черноморско-каспийской тюлек, обитающих в Каспийском море в близких локациях; высказать предположение о генезисе и таксономическом статусе исследованных видов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В результате учетных съемок НИС “Исследователь Каспия” в Каспийском море с 19 июля по 2 августа 2019 г. был собран материал по распределению, численности и биомассе черноморско-каспийской и анчоусовидной тюлек на акватории Северного и Среднего (Центрального) Каспия. Из общей выборки, направленной на биологический анализ, были изъяты ваучеры K19, *C. engrauliformis* (Средний Каспий, 43°45' с.ш., 48°30' в.д.) и K23, *C. cultriventris* (Северный Каспий, 44°51' с.ш., 49°04' в.д.). Морфологическая идентификация была проведена в соответствии с диагнозом А.Н. Световидова (1952). Для подтверждения определения оба ваучера были подвергнуты процедуре ДНК-баркодинга по локусу *COX1* согласно описанной ранее методике (Karabanov *et al.*, 2022), в результате чего подтверждена правильность отнесения ваучеров к роду *Clupeonella* с достаточными различиями (2.9%).

Геномная ДНК была выделена с помощью набора “QiAmp Mini Kit” (Qiagen, Netherlands) согласно протоколу производителя и отправлена на секвенирование с помощью платформы Illumina NovaSeq6000 в компанию Novogen (<https://www.novogene.com/>). В результате для *C. engrauliformis* и *C. cultriventris* были получены 75.5 и 65.5 млн парных прочтений по 150 пар нуклеотидов (п.н.) соответственно. Митохондриальные геномы были собраны с помощью NOVOPlasty v4.3.3 (Dierckxsens *et al.*, 2016), используя митогеном *C. cultriventris* NC\_015109.1 в качестве затравки. Полученные геномы были проаннотированы командой annotate из пакета MitoZ v3.6 (Meng *et al.*, 2019) и затем проверены и скорректированы вручную. Вторичные структуры нуклеиновых кислот макромолекул визуализированы веб-сервисом forna (Kerpedjiev *et al.*, 2015; <http://rna.tbi.univie.ac.at/forna/>). Для tPHK они были получены с помощью веб-сервиса tRNAScan-SE2.0 (Chan *et al.*, 2021; <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAScan-SE/>). В остальных случаях использовались структуры с минимальной свободной энергией, определенные автоматически. Вычисление предположительного времени дивергенции сельдевых с калибровкой “молекулярных часов” по Lavoie *et al.* (2013) проведено в пакете BEAST2 v.2.7.6 (Bouckaert *et al.*, 2019) согласно рекомендациям Barido-Sottani *et al.* (2018). Восстановление филогении проведено для всего набора “несвязанных” данных, было выполнено шесть независимых запусков с 10M генераций в каждом и с отбором каждого 10k дерева. Схождение всех цепей МСМС было достигнуто при значении эффективного размера выборки ESS > 200. Объединение полученных деревьев и вычисление консенсусного дерева

выполнено средствами пакета BEAST2 с игнорированием первых 20% деревьев. Систематика сельдеобразных дана в соответствии с последней редакцией “Fishes of the World” (Nelson *et al.*, 2016); в обсуждении приведены примеры “новой” систематики по Wang *et al.* (2022), приведенной в последней редакции FishBase (Froese, Pauly, 2024).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные уникальные последовательности депонированы в международную базу данных NCBI GenBank под номерами PP627228–PP627229 (*COXI*) и PP484644–PP484645 (полные митогеномы) для *C. engrauliformis* и *C. cultriventris* соответственно.

Кольцевой митохондриальный геном *C. engrauliformis* имеет длину 16652 п.н. (в сравнении с митогеномом *C. cultriventris*, имеющего длину в 16650 п.н.) и состоит из 13 белок-кодирующих генов (PCG), 22 транспортных РНК (tRNA), 2 рибосомальных РНК (rRNA) и некодирующей области контрольного региона (табл. 1, рис. 1). Длина, структура и организация митогенома соответствует таковым сельдевых рыб (Lavoie *et al.*, 2007). По нуклеотидному составу в митогеномах обоих видов тюлек преобладают пиримидиновые остатки (A% = 25.9/26.1, G% = 19.4/19.3, C% = 28.1/27.9, T% = 26.6/26.6 для *C. engrauliformis* и *C. cultriventris* соответственно) и наблюдается отрицательный GC-перекос (−0.184/−0.183). При этом для белок-кодирующих генов соотношение нуклеотидов у обоих видов практически не различается: A% = 23.2/23.5, G% = 18.8/18.6, C% = 28.8/28.6, T% = 29.1/29.2 и отрицательном GC-перекосе (−0.210/−0.211).

Общая длина PCG у обоих видов тюлек составляет 11436 п.н., что составляет 68.6% всего митогенома. Всего 13 генов, кодирующих белок, содержат 3812 кодонов, включая стоп- и старт-кодны (табл. 1). По частотам встречаемости конкретных кодонов в PCG митогенома анчоусовидная и черноморско-каспийская тюльки из Каспийского моря принципиально не различаются. Среди наиболее распространенных кодонов можно отметить СТТ, СТА, СТС (Leu), АТТ (Ile), GCC, CGA (Ala); из стоп-кодонов самым распространенным служит ТАА, стандартным старт-кодом является АТG (Доп. материал Table S1).

В анализируемом митохондриальном геноме тюлек обнаружены все 22 гена тРНК, типичные для рыб, из них 14 генов кодированы на Н-цепи и 8 генов – на L-цепи ДНК (табл. 1, рис. 1). Длина этих генов варьируется от 66 п.н. (*tRNA-Cys*) до 75 п.н. (*tRNA-Leu1*), общая длина всех транспортных РНК равна 1553 пн. Вторичная структура всех 22 тРНК представлена в Доп. материале Figure S1. Все тРНК образуют типичные вторичные структуры «клеверного листа», за исключением *tRNA-Ser2* (GCT),

у которых, как и у других рыб, редуцировано дигидроурациловое плечо (Satoh *et al.*, 2016).

Гены малой (*12s-rRNA*) и большой (*16s-rRNA*) субъединиц рРНК обоих видов тюлек имеют одинаковую длину и расположение. Ген *12s-rRNA* расположен между транспортными РНК *tRNA-Phe* и *tRNA-Val* и содержит 952 п.н. Ген *16s-rRNA* расположен между *tRNA-Val* и *tRNA-Leu1* и имеет длину 1680 п.н. (табл. 1). Вторичная структура обеих субъединиц митохондриальной РНК представлена в Доп. материале Figure S2. Как и у других рыб, рРНК тюльки имеет сложную дуплексно-петельную организацию с чередованием консервативных и варибельных участков (Satoh *et al.*, 2016).

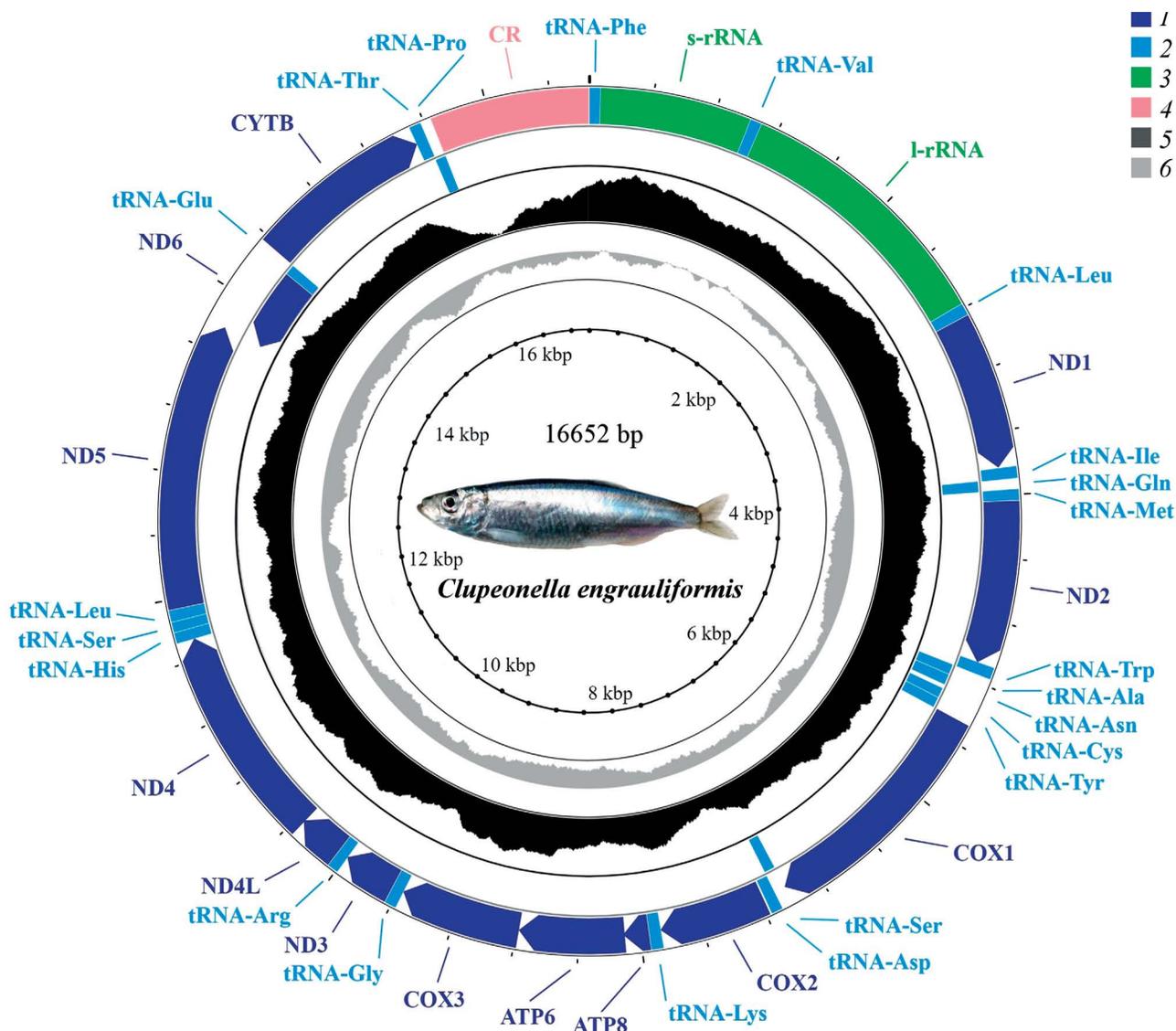
Репликатор легкой цепи ( $O_L$ ) мтДНК локализован в зоне WANCY (гены, кодирующие тРНК от триптофана до тирозина) между *tRNA-Asn* и *tRNA-Cys* (табл. 1). Протяженность  $O_L$  у обоих изученных видов тюлек составляет 31 п.н. и представляет собой петельную структуру из 8 п.н. дуплекса и 12 нуклеотидов петли (Доп. материал Figure S3). В последовательности петли  $O_L$  имеются две пуриновые транзиции, специфичные для анчоусовидной тюльки (табл. 1, Доп. материал Figure S3).

Существенные различия между обитающими в Каспийском море *C. engrauliformis* и *C. cultriventris* связаны с последовательностью контрольного региона мтДНК (*CR*, *D-loop*). Этот довольно компактный у тюлек регион митогенома локализован между *tRNA-Pro* и *tRNA-Phe* (рис. 1) и составляет 1005 п.н. у анчоусовидной и 1003 п.н. у черноморско-каспийской (схема организации представлена в Доп. материале Figure S4). Нуклеотидный состав контрольного региона специфичен, здесь существенно преобладают адениновые и тиминные остатки (A+T 61%), при этом GC-перекос существенно меньше, чем для кодирующих локусов (GC-skew контрольного региона составляет −0.106 и −0.097 для анчоусовидной и черноморско-каспийской тюлек соответственно). Причина компактности локуса *CR* у тюлек связана, прежде всего, с редуцированием терминального региона повторов и зоны поли-(ТА). Повторы в зоне ETAS у тюлек фактически отсутствуют, тогда как у других животных тандемы в *CR* (и в митогеноме в целом) могут существенно варьировать (Foggetti *et al.*, 2021). Терминальный участок со стороны петли также очень компактный: имеется только тетраповтор (ТА), а сама петля содержит лишь 4 нуклеотида (Доп. материал Figure S4). Непрерывная последовательность поли-Т (участок 641–649 гена *CR*), охватывающая девять нуклеотидов (предположительно, служит препятствием для секвеназы) локализуется перед АТ-богатой областью CSB-I. Также в контрольном регионе тюльки можно выделить локусы CSB-II и CSB-III (С-богатые регионы) и центральные консервативные домены CSB-F, CSB-E и CSB-D (самый консервативный

Таблица 1. Организация полноразмерного митохондриального генома *Clupeonella engrauliformis* (Каспийское море)

Ген	Цепь ДНК	Положение	Размер, п.н. / а.о.	Межгенный промежуток (п.н.)	Антикодон (для tRNA) или старт/стоп-кодон (для PCG)	D (Cc/Ca)
<i>tRNA-Phe</i>	+	1–68	68	0	GAA	0/1
<i>12s-rRNA</i>	+	69–1019	951	0	n/a	6/7
<i>tRNA-Val</i>	+	1020–1091	72	0	TAC	0/0
<i>16s-rRNA</i>	+	1092–2771	1680	0	n/a	19/16
<i>tRNA-Leu1</i>	+	2772–2846	75	0	TAA	0/0
<i>ND1</i>	+	2847–3821	975/325	5	ATG/TAG	34/31
<i>tRNA-Ile</i>	+	3827–3898	72	–1	GAT	0/0
<i>tRNA-Gln</i>	–	3898–3968	71	–1	TTG	1–0/0
<i>tRNA-Met</i>	+	3968–4036	69	0	CAT	1/0
<i>ND2</i>	+	4037–5081	1045/348	–2	ATG/T--	48/46
<i>tRNA-Trp</i>	+	5082–5153	72	1	TCA	0/0
<i>tRNA-Ala</i>	–	5155–5223	69	1	TGC	1/1
<i>tRNA-Asn</i>	–	5225–5297	73	0	GTT	0/0
<i>Q<sub>L</sub></i>	n/a	5298–5328	31	0	n/a	2/2
<i>tRNA-Cys</i>	–	5329–5394	66	2	GCA	0/0
<i>tRNA-Tyr</i>	–	5397–5467	71	1	GTA	1/1
<i>COX1</i>	+	5469–7019	1551/516	0	GTG/TAA	32/35
<i>tRNA-Ser1</i>	–	7020–7090	71	4	TGA	0/0
<i>tRNA-Asp</i>	+	7095–7164	70	12	GTC	0/0
<i>COX2</i>	+	7177–7867	691/230	0	ATG/T--	7/7
<i>tRNA-Lys</i>	+	7868–7941	74	1	TTT	1/0
<i>ATP8</i>	+	7943–8110	168/55	–10	ATG/TAA	3/3
<i>ATP6</i>	+	8101–8783	683/227	0	ATG/TA-	15/14
<i>COX3</i>	+	8784–9568	785/261	0	ATG/TA-	18/15
<i>tRNA-Gly</i>	+	9569–9640	72	0	TCC	1/1
<i>ND3</i>	+	9641–9989	349/116	0	ATG/T--	13/15
<i>tRNA-Arg</i>	+	9990–10058	69	0	TCG	1/1
<i>ND4L</i>	+	10059–10355	297/98	–7	ATG/TAA	8/8
<i>ND4</i>	+	10349–11729	1381/460	0	ATG/T--	59/61
<i>tRNA-His</i>	+	11730–11798	69	0	GTG	0/0
<i>tRNA-Ser2</i>	+	11799–11865	67	0	GCT	0/0
<i>tRNA-Leu2</i>	+	11866–11937	72	0	TAG	0/0
<i>ND5</i>	+	11938–13773	1836/611	–4	ATG/TAA	67/62
<i>ND6</i>	–	13770–14291	522/173	0	ATG/TAG	26/23
<i>tRNA-Glu</i>	–	14292–14360	69	4	TTC	0/0
<i>Cytb</i>	+	14365–15505	1141/380	0	ATG/T--	35/34
<i>tRNA-Thr</i>	+	15506–15577	72	–1	TGT	1/0
<i>tRNA-Pro</i>	–	15577–15646	70	0	TGG	0/0
<i>D-loop</i>	n/a	15647–16649	1003	1	n/a	50/49

Примечание. Цепь ДНК соответствует (+) для Н и (–) для L. Значение D в п.н. показывает различия между нуклеотидными последовательностями анчоусовидной тюльки (*C. engrauliformis*, Центральный Каспий, GenBank no. PP484644) относительно генетически наиболее близких видов: черноморско-каспийской тюльки (*C. cultriventris*, Северный Каспий, GenBank no. PP484645) и пресноводной абраусской тюльки (*C. abrau*, оз. Абрау, GenBank no. NC\_086922.1) соответственно.



**Рис. 1.** Круговая карта митохондриального генома *Clupeonella engrauliformis* (Средний Каспий). Внешний круг указывает расположение генов в митогеноме. Гены, кодируемые Н(+) и L(-) цепью ДНК, отображаются во внешнем и внутреннем кольцах соответственно. Условные обозначения: 1 – гены, кодирующие белки; 2 – транспортная РНК; 3 – рибосомальная РНК; 4 – контрольная область; 5 – содержание нуклеотидов G и C в молекуле ДНК (GC-содержание; диапазон значений 0.337–0.561); 6 – распределение нуклеотидов G+C в молекуле ДНК (GC-перекос; диапазон значений –0.4–0.4). Размерность выражена в тыс.п.н. (kbp).

у рыб Т-богатый регион). При этом терминальная часть консервативной последовательности CSB-E (так называемый GTGGG-box) у тюлек имеет одну транзицию (GTGAG).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В целом организация митохондриального генома анчоусовидной и черноморско-каспийской тюлек из Каспийского моря принципиально

не отличается от таковой у других сельдевых рыб. Основные отличия между исследованными видами касаются контрольного региона мтДНК. Его сложная организация играет роль в репликации и транскрипции генома у рыб (Sato *et al.*, 2016). По общему счету различия между геномами составляют 449 нуклеотидов (2.69%), при этом вариативность по 50 позициям (в том числе 2 инсерции) приходится на некодирующую последовательность контрольного региона. Несмотря на частое игнорирование локуса *CR* в таксономических

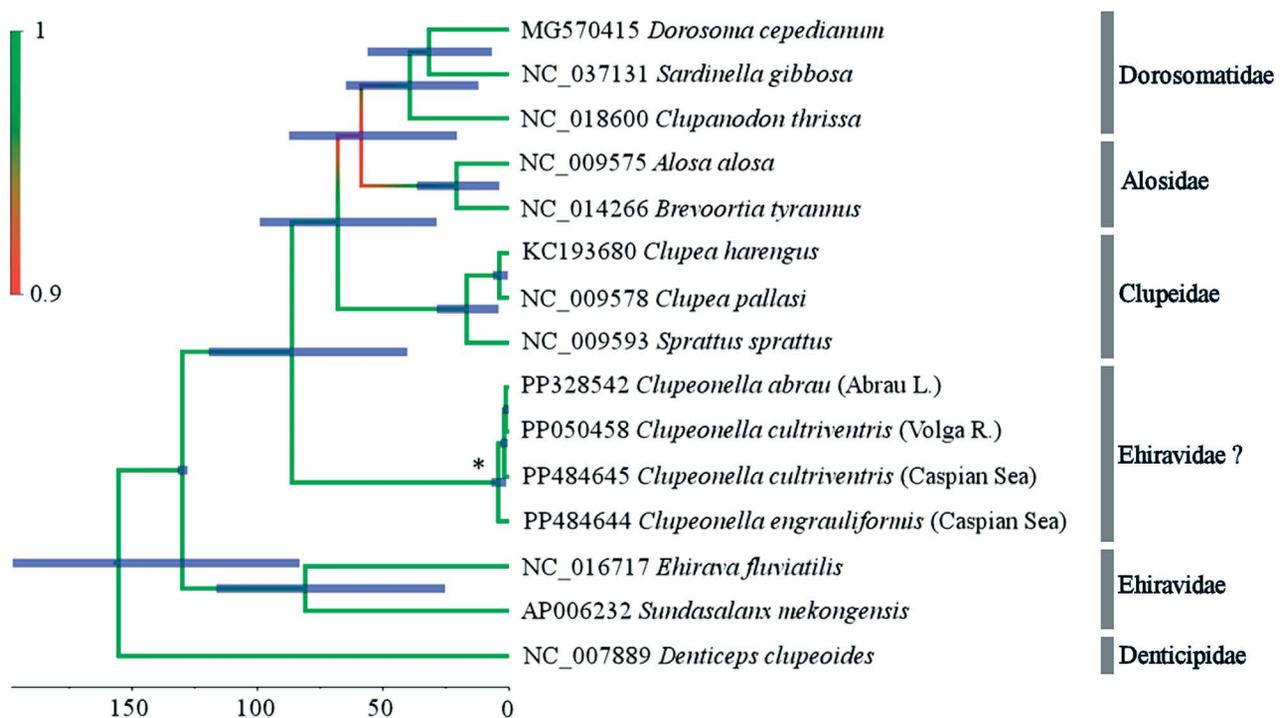
и филогенетических работах (например, Lavoue *et al.*, 2007), именно он зачастую дает надежную делимитацию для видов, хорошо различающихся по биологии, но с низкой изменчивостью в локусах, применяемых для ДНК-баркодинга (Artamonova *et al.*, 2013).

Если добавить в анализ митогеном родственного вида, абраусской тюльки *Clupeonella abraui* (Maliatsky, 1930) из оз. Абрау (NCBI Reference Sequence NC\_086922.1), то можно отметить различия (табл. 1) между этим пресноводным видом и морской анчоусовидной тюлькой в 433 п.н. (2.6%). При этом различия между пресноводной абраусской и солоноватоводной черноморско-каспийской тюльками значительно меньше – 221 п.н. (1.32%), без инсерций в контрольном регионе. Это может объясняться либо более поздним общим происхождением, либо адаптациями к обитанию в маломинерализованной среде, либо значительной полиморфностью вида *C. cultriventris* (при котором абраусская тюлька может рассматриваться как пресноводная форма черноморско-каспийского вида). В любом случае статус *C. engrauliformis* как “хорошего” вида, генетически обособленного от других родственных таксонов, не вызывает сомнения.

Дифференциация анчоусовидной тюльки от возможного общего предка с черноморско-каспийской

тюлькой, исходя из калиброванного дерева по Lavoue *et al.* (2013), показывает вероятность этого процесса в позднем или среднем плиоцене (рис. 2). Если провести пересчет скорости нуклеотидных замен согласно его средней скорости для сельдевых рыб на уровне около 1% за 3.6 млн л. (Canales-Aguirre *et al.*, 2021), время расхождения сдвигается на поздний миоцен (9.3 млн л. назад). При кажущемся большом временном разбросе эти оценки, по-видимому, указывают на процессы, связанные с трансгрессией и деградацией Понтического озера-моря, образовавшегося в результате замыкания Сарматского моря – остатка Паратетиса и существовавшего примерно с 8 млн л.н. (Popov *et al.*, 2006). Судя по современным палеогеографическим реконструкциям (Palcu *et al.*, 2021), именно к середине миоцена солоноватое Понтическое “мега-озеро” достигло наибольшего развития. К концу миоцена началась сильная регрессия и связанное с этим существенное осолонение в акватории современного Южного Каспия (Popov *et al.*, 2004) – вероятного предкового ареала анчоусовидной тюльки, вплоть до фрагментации бассейна на отдельные слабосвязанные акватории, различавшихся по факторам среды, например, солености (Esin *et al.*, 2018).

Вероятно, именно в ходе среднепоздней плиоценовой трансгрессии Каспия (Popov *et al.*, 2004)



**Рис. 2.** Филогенетическая хронограмма некоторых Clupeiformis, основанная на полном наборе митогеномных данных, байесова филогения восстановлена в BEAST2 на основании откалиброванного дерева по (Lavoue *et al.*, 2013). Систематика приведена по (Wang *et al.*, 2022). Апостериорная вероятность (поддержка ветвления) обозначена цветовой шкалой. Голубые столбцы в узлах отражают 95% доверительные интервалы времени дивергенции. Знаком \* обозначено время вероятной дивергенции анчоусовидной тюльки от общего предка (период около  $4.2 \pm 2.8$  млн л.н.).

произошло вторичное объединение ранее изолированных предковых ареалов современных анчоусовидной и черноморско-каспийской тюлек. Отметим, что и ныне наблюдается экологическая подразделенность двух видов: первая из тюлек приурочена к более минерализованной южной и центральной зоне, а вторая — к более пресной северной зоне Каспия (Приходько, 1979). Эти современные различия двух видов тюлек могут быть связаны с разными адаптациями их предков к специфическим условиям в разных водоемах — остатках Понтического “мега-озера”. Вероятно, дифференциация тюлек началась в миоцене (“нижняя” датировка, по пересчету замен), продолжилась в плиоцене и завершилась уже к плейстоцену (“верхняя” датировка исходя из байесовой филогении).

Подобная реконструкция позволяет объяснить и возможный сценарий образования жилых пресноводных форм, характерных для р. *Clupeonella* (Световидов, 1952). Вероятно, все они (такие как абраусская тюлька и чархальская морфа черноморско-каспийской тюльки) являются пресноводными реликтами периода регрессии солоноватоводного Понтического озера-моря. Высокий полиморфизм у тюльки (Karabanov *et al.*, 2022) можно объяснить недавним и быстрым отделением видов от ближайшего общего предка (MRCA), что привело к сохранению предковых полиморфизмов, определяющих неполную сортировку линий при восстановлении филогении и, возможно, интрогрессивной гибридизации (Phillips *et al.*, 2022). В пользу сохранения предковых полиморфизмов, в частности, могут свидетельствовать наблюдаемые паттерны географического распределения некоторых аллозимов пресноводных (инвазивных) популяций черноморско-каспийской тюльки (Karabanov, Kodukhova, 2018). Вероятно, это и послужило причиной разделения *C. cultriventris* на несколько разных видов, населяющих бассейны Понто-Каспийского региона (Froese, Pauly, 2024). Однако в случае таких полиморфных видов многие генетические методы делимитации будут давать ложноположительный результат (Karabanov *et al.*, 2023a), особенно при отсутствии реперного “хорошего” вида. Введение в матрицу дистанций (Доп. материал Table S2) анчоусовидной тюльки больше свидетельствует в пользу мнения А.Н. Световидова (1952) о разных формах черноморско-каспийской тюльки, чем о нескольких видах (особенно четко это прослеживается при сравнении с “хорошим” видом — анчоусовидной тюлькой). В данном случае, если рассматривать только локус *COX1*, используемый в ДНК-баркодинге, различия между анчоусовидной и разными группами популяций черноморско-каспийской тюльки составляют порядка 3%, что достаточно для “хороших видов” (Phillips *et al.*, 2022). Если считать обыкновенных тюлек Черноморско-Азовского, Каспийского и Волжского бассейнов за отдельные виды, то дистанции

между ними будут в три раза меньше (порядка 1%) и сравнимы с внутригрупповой вариабельностью (Доп. материал Table S2), что все же более характерно для форм, а не видов (Картавец, 2013).

Отдельно стоит отметить различия в топологии восстановленного филогенетического дерева на основании митохондриальных данных, приведенного в данной работе (рис. 2) по сравнению с работами С. Лаву с соавторами (Lavoue *et al.*, 2007, 2013). Подобные различия, видимо, связаны с набором анализируемых последовательностей: мы использовали полные митогеномы, включающие все нуклеотидные позиции для анализа, тогда как в других работах (Lavoue *et al.*, 2007 и далее) из него были исключены все последовательности контрольного региона, не кодирующие участки и третья позиция кодона для белок-кодирующих генов. При этом единственная последовательность *C. cultriventris* располагается базально относительно пресноводных селедочек (Lavoue *et al.*, 2013, fig.3) и, если пересчитать, по квадратам расстояний даже ближе к *Alosa*, чем к *Ehirava*. Вместе с тем даже по простому счету по митогеномам (и без учета контрольного региона) расхождение Хэмминга между тюлькой и алозой составляет 17%, тогда как с эхиравой — 19%. Однако обсуждение систематики сельдевых рыб выходит за рамки данной работы и требует отдельного изучения. Но все же, несмотря на ряд публикаций (Lavoue *et al.*, 2007, 2013; Wang *et al.*, 2022), положенных в основу “новой” макросистематики рыб (Froese, Pauly, 2024), мы придерживаемся консервативной точки зрения Дж. Нельсона (Nelson *et al.*, 2016) и не видим достаточных оснований перенесения *Clupeonella* в пресноводные селедочки Ehiravidae.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые представлена проаннотированная полная последовательность митохондриальной ДНК анчоусовидной (16652 п.н.) и депонированной второй геном черноморско-каспийской тюльки (16650 п.н.) из Каспийского моря. Митогеном тюльки имеет консервативное расположение генов и включает типичный для рыб набор из 2 генов рибосомальной РНК, 22 генов транспортной РНК, 13 белок-кодирующих генов и контрольного региона. Анализ нуклеотидной изменчивости полного митохондриального генома тюлек представляет дополнительные данные для таксономии сельдевых рыб.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Дополнительный материал (Supplementary materials, Table S1–S2, Fig.S1–S5) публикуется только

в электронном формате на сайтах <https://link.springer.com> и <https://www.elibrary.ru>.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность руководству Волжско-Каспийского филиала ГНЦ РФ ФГБНУ “ВНИРО” (“КаспНИРХ”) и администрации ИБВВ РАН, а также научному составу и экипажу НИС “Исследователь Каспия” за неоценимую помощь в организации и проведении работ.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Генетические работы выполнены за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-14-00128, <https://rscf.ru/project/23-14-00128/>

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работы выполнены в соответствии с “Программой научно-исследовательских работ ИБВВ РАН” на 2018-2022 гг. (утверждена 04.08.2017 г., приказ ФАР МСХ РФ № 702 от 30.11.2018 г.) с соблюдением российских и международных норм обращения с животными. Лабораторных экспериментов и содержание животных в неволе в данной работе не проводилось.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Казанчев Е.Н.* Рыбы Каспийского моря. Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1981. 168 с.
- Картавец Ю.Ф.* Генетическая дивергенция видов и других таксонов. Географическое видообразование и генетическая парадигма неodarвинизма в действии // *Успехи современной биологии*. 2013. Т. 133. № 5. С. 419–451.
- Помогаева Т.В., Татарников В.А.* Особенности пространственного распределения каспийских килек в средней части Каспийского моря в летний период по результатам гидроакустических исследований // *Труды ВНИРО*. 2021. Т. 184. С. 87–98. <https://doi.org/10.36038/2307-3497-2021-184-87-98>
- Приходько Б.И.* 1979. Экологические черты каспийских килек (род *Clupeonella*) // *Вопросы ихтиологии*. Т. 19. № 5. С. 801–812.
- Разинков В.П., Парицкий Ю.А., Грозеску Ю.Н.* Биология и современное состояние запаса анчоусовидной кильки (*Clupeonella engrauliformis* Bogodin) // *Вестник Астраханского государственного технического университета*. Серия: Рыбное хозяйство. 2020. Т. 2020. № 2. С. 45–51. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2020-2-45-51>
- Световидов А.Н.* Сельдевые (Clupeidae). Фауна СССР. Рыбы. Том 2. Выпуск 1. Москва, Ленинград: Издательство АН СССР, 1952. 333 с.
- Artamonova V.S., Makhrov A.A., Karabanov D.P., Rolskiy A. Yu., Bakay Yu.I., Popov V.I.* Hybridization of beaked redfish (*Sebastes mentella*) with small redfish (*Sebastes viviparus*) and diversification of redfish (Actinopterygii: Scorpaeniformes) in the Irminger Sea // *Journal of natural history*. 2013. V. 47. № 25-28. P. 1791–1801. <https://doi.org/10.1080/00222933.2012.752539>
- Barido-Sottani J., Boskova V., Plessis L., Kuhnert D., Magnus C., Mitov V., Muller N.F., Pecerska J., Rasmussen D.A., Zhang C.* Taming the BEAST – a community teaching material resource for BEAST2 // *Systematic Biology*. 2018. V. 67. № 1. 170–174. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syx060>
- Bouckaert R., Vaughan T.G., Barido-Sottani J., Duchene S., Fourment M., Gavryushkina A., Heled J., Jones G., Kuhnert D., De Maio N.* BEAST 2.5: an advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis // *PLoS computational biology*. 2019. V. 15. № 4. P. e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>
- Canales-Aguirre C.B., Ritchie P.A., Hernandez S., Herrera-Yanez V., Ferrada Fuentes S., Oyarzun F.X., Hernandez C.E., Galleguillos R., Arratia G.* Phylogenetic relationships, origin and historical biogeography of the genus *Sprattus* (Clupeiformes: Clupeidae) // *Peer J*. 2021. V. 9. P. e11737. <https://doi.org/10.7717/peerj.11737>
- Chan P.P., Lin B.Y., Mak A.J., Lowe T.M.* tRNAscan-SE2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes // *Nucleic acids research*. 2021. V. 49. № 16. P. 9077–9096.
- Daskalov G.M., Mamedov E.V.* Integrated fisheries assessment and possible causes for the collapse of anchovy kilka in the Caspian Sea // *ICES Journal of Marine Science*. 2007. V. 64. № 3. P. 503–511. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsl047>
- Dierckxsens N., Mardulyn P., Smits G.* NOVOPlasty: De novo assembly of organelle genomes from whole genome data // *Nucleic acids research*. 2016. V. 45. № 4. P. e18. doi: 10.1093/nar/gkw955
- Duchene S., Archer F.I., Vilstrup J., Caballero S., Morin P.A.* Mitogenome phylogenetics: the impact of using single regions and partitioning schemes on topology, substitution rate and divergence time estimation // *PLoS ONE*. 2011. V. 6. № 11. P. e27138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027138>
- Esin N.V., Yanko-Hombach V.V., Esin N.I.* Evolutionary mechanisms of the Paratethys Sea and its separation

- into the Black Sea and Caspian Sea // *Quaternary International*. 2018. V. 465. P. 46–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.quaint.2016.06.019>
- FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2020. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023. 193 p.  
<https://doi.org/10.4060/cc7493en>
- Formenti G., Rhie A., Balacco J., Haase B., Mountcastle J., Fedrigo O., Brown S., Capodiferro M.R., Al-Ajli F.O., Ambrosini R. Complete vertebrate mitogenomes reveal widespread repeats and gene duplications // *Genome Biology*. 2021. V. 22. P. e120.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-021-02336-9>
- Froese R., Pauly D. (Eds.) FishBase. 2024. World Wide Web electronic publication: version 02/2024. www.fishbase.org (accessed 10 April 2024).
- Karabanov D.P., Kodukhova Y.V. Biochemical polymorphism and intraspecific structure in populations of Kilka *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) from natural and invasive parts of its range // *Inland Water Biology*. 2018. V. 11. № 4. P. 496–500.  
<https://doi.org/10.1134/S1995082918040107>
- Karabanov D.P., Bekker E.I., Pavlov D.D., Borovikova E.A., Kodukhova Y.V., Kotov A.A. New sets of primers for DNA identification of non-indigenous fish species in the Volga-Kama basin (European Russia) // *Water*. 2022. V. 14. № 3. P. e437.  
<https://doi.org/10.3390/w14030437>
- Karabanov D.P., Kotov A.A., Borovikova E.A., Kodukhova Y.V., Zhang X. Comparison of the efficiency of single-locus species delimitation methods: a case study of a single lake fish population in comparison against the barcodes from international databases // *Water*. 2023a. V. 15. № 10. P. e1851.  
<https://doi.org/10.3390/w15101851>
- Karabanov D.P., Pavlov D.D., Dgebuadze Y.Y., Bazarov M.I., Borovikova E.A., Gerasimov Y.V., Kodukhova Y.V., Mikheev P.B., Nikitin E.V., Opaleva T.L. A dataset of non-indigenous and native fish of the Volga and Kama Rivers (European Russia) // *Data*. 2023b. V. 8. № 10. P. e154.  
<https://doi.org/10.3390/data8100154>
- Kaymaram F., Salarpour A., Di Dario F. *Clupeonella engrauliformis*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2018. The International Union for Conservation of Nature. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T98471289A143838562.en>
- Kerpedjiev P., Hammer S., Hofacker I.L. Forna (force-directed RNA): Simple and effective online RNA secondary structure diagrams // *Bioinformatics*. 2015. V. 31. № 20. P. 3377–3379.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv372>
- Lavoue S., Miya M., Saitoh K., Ishiguro N.B., Nishida M. Phylogenetic relationships among anchovies, sardines, herrings and their relatives (*Clupeiformes*), inferred from whole mitogenome sequences // *Molecular phylogenetics and evolution*. 2007. V. 43. № 3. P. 1096–1105.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.09.018>
- Lavoue S., Miya M., Musikasinthorn P., Chen W.-J., Nishida M. Mitogenomic evidence for an Indo-West Pacific origin of the Clupeoidei (Teleostei: Clupeiformes) // *PLoS ONE*. 2013. V. 8. № 2. P. e56485.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056485>
- Meng G., Li Y., Yang C., Liu S. MitoZ: a toolkit for animal mitochondrial genome assembly, annotation and visualization // *Nucleic acids research*. 2019. V. 47. № 11. P. e63.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz173>
- Nelson J.S., Grande T., Wilson M.V.H. *Fishes of the World*, fifth edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016. 707 p.  
<https://doi.org/10.1002/9781119174844>
- Palcu D.V., Patina I.S., Sandric I., Lazarev S., Vasilev I., Stoica M., Krijgsman W. Late Miocene megalake regressions in Eurasia // *Scientific Reports*. 2021. V. 11. № 1. P. e11471.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-91001-z>
- Phillips J.D., Gillis D.J., Hanner R.H. Lack of statistical rigor in DNA barcoding likely invalidates the presence of a true species' barcode gap // *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2022. V. 10. P. e859099.  
<https://doi.org/10.3389/fevo.2022.859099>
- Popov S.V., Rogl F., Rozanov A.Y., Shcherba I.G., Steininger F.F. Lithological-Paleogeographic maps of Paratethys: 10 maps Late Eocene to Pliocene. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 2004. 46 p.
- Popov S.V., Shcherba I.G., Ilyina L.B., Nevesskaya L.A., Paramonova N.P., Khondkarian S.O., Magyar I. Late Miocene to Pliocene palaeogeography of the Paratethys and its relation to the Mediterranean // *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 2006. V. 238. № 1-4. P. 91–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2006.03.020>
- Satoh T.P., Miya M., Mabuchi K., Nishida M. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. № 1. P. e719.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3054-y>
- UNEP, 2011. Caspian Sea: State of the environment report 2010. Report by the interim Secretariat of the Framework Convention for the Protection of the Marine Environment of the Caspian Sea and the Project Coordination Management Unit of the "CaspEco" project. GRID-Arendal: United Nations Environment Programme, 2010. 109 p.
- Wang Q., Dizaj L.P., Huang J., Sarker K.K., Kevrekidis C., Reichenbacher B., Esmaeili H.R., Straube N., Moritz T., Li C. Molecular phylogenetics of the Clupeiformes based on exon-capture data and a new classification of the order // *Molecular phylogenetics and evolution*. 2022. V. 175. P. e107590.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107590>

**A comparative analysis of complete mitochondrial genomes  
of two tülka *Clupeonella kessler, 1877* (Actinopterygii: Clupeidae)  
species allowed to clarify their evolutionary history in the Ponto-Caspian region**

**D. P. Karabanov<sup>1, #</sup>, N. V. Kozlova<sup>2</sup>, D. D. Pereboev<sup>3</sup>, B. D. Efeikin<sup>3</sup>, A. A. Kotov<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Papanin Institute for Biology of Inland Waters of the Russian Academy of Sciences, IBIW, 109, Borok, 152742 Russia*

<sup>2</sup>*Volga-Caspian Branch of the Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (“CaspNIRKH”),  
Savushkina, 1, Astrakhan, 414056 Russia*

<sup>3</sup>*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences,  
Leninskiy Prosp., 33, Moscow, 119071 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: dk@ibiw.ru*

This paper presents a comparative analysis of mitochondrial genome of the anchovy sprat *Clupeonella engrauliformis* and the Black and Caspian Sea sprat *C. cultriventris* from the Caspian Sea. The mitogenome of tülka has a length of about 16.6 thousand bp and is characterized by a gene order conservative for herring fishes. The difference between the mitochondrial genomes of anchovy and Black and Caspian Sea sprats concerns 449 bp (2.7%), including two insertions in the control region, unknown in other representatives of the genus *Clupeonella*. The differentiation of tülkas is probably related to transgression and degradation of the Pontic Lake-Sea: it began in the Miocene, continued in the Pliocene, and was completed by the Pleistocene. The modern differences of tülkas may be connected with different adaptations of their ancestors to specific conditions in different water bodies – remnants of the Pontic “Mega-lake”.

*Keywords:* genomics, mitochondrial genome, fish, anchovy sprat, tülka, *Clupeonella engrauliformis*, *Clupeonella cultriventris*, Caspian Sea