

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И РОДСТВЕННЫЕ СВЯЗИ *Cottus kolyomensis* Sideleva et Goto, 2012 (Cottidae)

© 2023 г. О. А. Радченко^{1, *}, И. Н. Морева^{1, 2}, А. В. Петровская¹

¹Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Магадан, 685000 Россия

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного
отделения Российской академии наук, Владивосток, 690041 Россия

*e-mail: mradchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 11.05.2022 г.

После доработки 16.06.2022 г.

Принята к публикации 07.07.2022 г.

Впервые проведено кариологическое и молекулярно-генетическое (гены *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК) изучение пресноводного вида рыб *Cottus kolyomensis*, описанного недавно из рек Дукча и Колыма на северо-востоке Азии. Определен комплекс кариологических и молекулярно-генетических маркерных признаков, позволяющих идентифицировать вид. Обнаружены генетические различия популяций *C. kolyomensis*, населяющих водоемы бассейнов р. Колымы и северной части Охотского моря, на основании которых вид разделяется на группы в соответствии с местом обитания. Подтверждено существование в пределах рода *Cottus* отдельной группы “*Cottus poecilopus*”, в которую входят таксоны видового ранга, в том числе и *C. kolyomensis*.

Ключевые слова: рогатковые рыбы, кариотип, маркерные хромосомы, митохондриальная ДНК (мтДНК), гены *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК, молекулярная филогения, перичентрические инверсии.

DOI: 10.31857/S0016675823030104, **EDN:** IQJEIM

Арктически-бореальный подкаменщик *Cottus kolyomensis* Sideleva et Goto, 2012 описан из рек Колыма и Дукча на северо-востоке Азии [1]. Пресноводный, озерно-речной вид предпочитает участки рек с быстрым течением и каменисто-галечным грунтом, ведет уединенный образ жизни, прячется под камнями. Биология и распространение вида слабо изучены, границы ареала не известны.

История исследования *C. kolyomensis* началась задолго до его описания, когда в бассейнах рек Чаун и Колыма, а также в водоемах северного побережья Охотского моря была обнаружена новая форма подкаменщиков, обозначенная как *Cottus* sp. [2]. Подробный сравнительный морфологический анализ не позволил идентифицировать нового подкаменщика ни с одним из известных видов рода *Cottus*, но позволил определить его родство с видами группы “*Cottus poecilopus*”. Загадочный *Cottus* sp. получил видовой статус лишь спустя 30 лет после его находки [1].

Подкаменщиков группы “*Cottus poecilopus*” объединяет и одновременно отличает от других видов рода *Cottus* ряд морфологических признаков: длинный брюшной плавник, доходящий до анального отверстия, с укороченным внутренним лучом и множеством темных поперечных полос

(обычно 7–15), костные шипики под грудным плавником [1]. Колымский подкаменщик отличается от видов группы “*Cottus poecilopus*” комбинацией морфологических признаков, в их числе: сильно редуцированный внутренний луч брюшного плавника, зубы на небных костях, широкое межглазничное пространство, туловишный сейсмический канал неполный, пятая пора в предкрышечно-нижнечелюстном канале парная [1].

В группу “*Cottus poecilopus*” включают семь видов, обитающих в крупных речных системах: *C. poecilopus* Heckel, 1837 из рек Центральной Европы, *C. altaicus* Kaschenko, 1899 из бассейна р. Иртыш, *C. szanaga* Dybowski, 1869 из бассейна р. Амур, *C. kuznetzovi* Berg, 1903 из бассейна р. Лена, *C. volki* Таранец, 1933 из рек Приморья, *C. koreanus* Fujii, Choi et Yabe, 2005 из рек Кореи, *C. kolyomensis* из бассейна р. Колыма и водоемов северного побережья Охотского моря [1, 3–5]. Другая точка зрения — существование широко распространенного политипического вида *Cottus poecilopus*, географически изолированные группы которого рассматриваются в ранге подвидов [6]. В последнем случае *C. kolyomensis* считается подвидом — пестроногим колымским подкаменщиком *Cottus poecilopus kolyomensis* [7].

Исследованию *C. kolyomensis* посвящены лишь единичные работы по морфологии [1, 2] и молекулярно-генетическому анализу с использованием контрольного региона мтДНК [8], информативность которого может быть ограничена в связи с высоким уровнем вариабельности. Кариотип колымского подкаменщика не исследован. Очевидно, что дискуссионность таксономического статуса и недостаточная изученность *C. kolyomensis* требуют пристального внимания и развития исследований, в том числе с помощью молекулярно-генетических и кариологических методов. Эффективность их совместного использования подтверждена результатами изучения генетической изменчивости и филогенетических отношений в других таксонах семейства Cottidae [9].

В настоящей работе впервые проведено описание цитотипов и их сравнительное изучение, а также анализ изменчивости генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК мтДНК *C. kolyomensis*, обитающего в реках и озерах Охотско-Колымского края на северо-востоке Азии. В анализ включены экземпляры из типового местообитания колымского подкаменщика – р. Дукча на северном побережье Охотского моря. Полученные цитогенетические и молекулярно-генетические данные позволяют оценить географическую изменчивость *C. kolyomensis* из водоемов бассейна Охотского моря и р. Колымы, определить генетическую дифференциацию вида в пределах рода *Cottus* и его взаимосвязь с видами группы “*Cottus poecilopus*”.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объем исследованного материала приведен в табл. 1. Рыбы выловлены с помощью сачков (реки Дукча и Кулькуты, бассейн Охотского моря), ловушек (озера Момонтай и Урультун, бассейн р. Колыма), сетей (озера Чистое и Глухое, бассейн Охотского моря). Видовая принадлежность экземпляров определена по морфологическим признакам [10]. Изученные образцы хранятся в коллекции лаборатории ихтиологии Института биологических проблем Севера, Магадан, Россия (номера ваучеров приведены в табл. 1).

Молекулярно-генетический анализ

Проведен анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК мтДНК 25 экз. *C. kolyomensis* и 2 экз. *C. cognatus* Richardson, 1836. Для сравнительного молекулярно-генетического анализа использованы данные из GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) по другим 12 видам рода *Cottus*. Виды *Mesocottus haiteji* (Dybowski, 1869) и *Trachidermus fasciatus* Heckel, 1837 (подсемейство Cottinae, семейство Cottidae) 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 [11]. 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 [12]. 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 *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК мтДНК в программе MEGA X [13] 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 [14]. Для контроля динамики байесовского анализа использована программа Tracer v1.7 [15]. Установки для анализа MCMC: 4 цепи, 1000000 генераций, отбор деревьев через каждые 100 генераций. Значения вероятности достигли плато в течение 10000–15000 генераций. Значения логарифмической вероятности увеличились с менее чем –7542,730 до примерно –4213,251 в первых 5000 генераций, затем примерно до –3678,552 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 оценками вероятности $\geq 95\%$ приняты как достоверные [16]. Для определения взаимосвязей гаплотипов *C. kolyomensis* построено UPGMA дерево с двухпараметрической моделью Кимуры и оценкой достоверности топологии в 10000 повторных псевдослучайных выборок бутстрэп-анализа (MEGA X); узлы ветвления с бутстрэпами $\geq 70\%$ приняты как достоверные [16].

Кариологический анализ

Изучены кариотипы четырех самок, трех самцов *C. kolyomensis*. Хромосомные препараты приготовлены из суспензии клеток переднего отдела почки рыб методом воздушного высушивания [17]. Для первичного анализа кариотипа хромосомы окрашивали 4%-ным раствором красителя Гимза (Giemsa). Хромосомные препараты исследовали под микроскопом Leica. Лучшие метафазные пластинки были сфотографированы с помощью камеры AxioCam HR CCD с программным обеспе-

Таблица 1. Данные об изученных экземплярах *Cottus kolyomensis*, видов рода *Cottus* и внешней группы (* – образцы изучены кариологически)

Вид (ваучерный номер образца)	Район сбора	Номер в GenBank		
		<i>COI</i>	<i>16S</i> рРНК	ген цитохрома <i>b</i>
<i>Cottus kolyomensis</i> (2222)	Бассейн р. Колыма, оз. Момонтай	ON358200	ON358132	ON364525
<i>C. kolyomensis</i> (2060)	»	ON358201	ON358133	ON364526
<i>C. kolyomensis</i> (2256)	»	ON358206	ON358138	ON364531
<i>C. kolyomensis</i> (2257)	»	ON358207	ON358139	ON364532
<i>C. kolyomensis</i> (2268)	»	ON358208	ON358140	ON364533
<i>C. kolyomensis</i> (2279)	»	ON358209	ON358141	ON364534
<i>C. kolyomensis</i> (2322)	»	ON358222	ON358154	ON364547
<i>C. kolyomensis</i> (2320)	Бассейн р. Колыма, оз. Урультун	ON358220	ON358152	ON364545
<i>C. kolyomensis</i> (2321)	»	ON358221	ON358153	ON364546
<i>C. kolyomensis</i> (2250)	Бассейн Охотского моря, бухта Гертнера, р. Дукча	ON358202	ON358134	ON364527
<i>C. kolyomensis</i> (2248)	»	ON358203	ON358135	ON364528
<i>C. kolyomensis</i> (2238)	»	ON358204	ON358136	ON364529
<i>C. kolyomensis</i> (2239)	»	ON358205	ON358137	ON364530
<i>C. kolyomensis</i> (2315)*	»	ON358216	ON358148	ON364541
<i>C. kolyomensis</i> (2316)*	»	ON358217	ON358149	ON364542
<i>C. kolyomensis</i> (2318)*	»	ON358218	ON358150	ON364543
<i>C. kolyomensis</i> (2319)*	»	ON358219	ON358151	ON364544
<i>C. kolyomensis</i> (2335)	Бассейн Охотского моря, бассейн р. Ола, оз. Чистое	ON358223	ON358155	ON364548
<i>C. kolyomensis</i> (2324)	»	ON358224	ON358156	ON364549
<i>C. kolyomensis</i> (2314)	Бассейн Охотского моря, Амахтонский залив, оз. Глухое	ON358215	ON358147	ON364540
<i>C. kolyomensis</i> (2285)*	Бассейн Охотского моря, залив Одян, р. Кулькиуты	ON358210	ON358142	ON364535
<i>C. kolyomensis</i> (2286)*	»	ON358211	ON358143	ON364536
<i>C. kolyomensis</i> (2287)*	»	ON358212	ON358144	ON364537
<i>C. kolyomensis</i> (2288)	»	ON358213	ON358145	ON364538
<i>C. kolyomensis</i> (2289)	»	ON358214	ON358146	ON364539
<i>C. cognatus</i> (2290)	Чукотка, термальные источники р. Гильмимливеем	ON358225	ON358157	ON364550
<i>C. cognatus</i> (2291)	»	ON358226	ON358158	ON364551
<i>C. rhenanus</i>	Германия, Северный Рейн-Вестфалия	MF326941		
<i>C. perifretum</i>	Бельгия, Фландрия	MF326940		
<i>C. asper</i>	США, Калифорния, Гумбольдт, р. Редвуд-Крик	MF326939		
<i>C. dzungaricus</i>	Китай, р. Иртыш	MH638324		
<i>C. hangiongensis</i>	Корейский п-ов	NC014851		
<i>C. koreanus</i>	Корейский п-ов	EU332750		
<i>C. poecilopus</i>	Китай, Хэйлунцзян, р. Амур	MW448544		
<i>C. szanaga</i>	Приморский край, р. Соболевка	NC032039		
<i>C. czerskii</i>	Китай, Хэйлунцзян, Ичунь	NC025242		
<i>C. volki</i>	Приморский край, р. Алексеевка	NC035001		
<i>C. cognatus</i>	США, Висконсин, оз. Верхнее	MW856888		
<i>C. amblystomopsis</i>	Сахалин, р. Таранай	NC035002		
<i>C. bairdii</i>	США, Пенсильвания, р. Аллегейни	MW856840		
<i>Mesocottus haitej</i>	Приморский край, р. Арму	KF170218		
<i>Trachidermus fasciatus</i>	Нет данных	JX017305		

чением AXIOVISION (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия). Микроскопию и визуализацию проводили в Дальневосточном центре электронной и световой микроскопии Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН, Владивосток.

Использовали общепринятую в цитогенетических исследованиях классификацию хромосом [18]. 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 10 представителей рода *Cottus* [19–27]. Субтелоцентрики видов *C. koreanus* и *C. hangiongensis*, учитывая указанное число хромосом и число хромосомных плеч, трактуются авторами настоящей публикации как двуплечие хромосомы. Одноплечие хромосомы в кариограммах этих видов обозначены как телоцентрики (Т) [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ

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.

Обнаружены следующие показатели генетической изменчивости видов рода *Cottus*. Для гена *COI* (939 пар нуклеотидов, пн) идентифицировано 264 нуклеотидные замены и 219 полиморфных сайтов, 164 (17.5%) замены филогенетически информативные. Из 313 кодируемых аминокислотных остатков два переменных. Для гена цитохрома *b* (840 пн) идентифицировано 274 нуклеотидные замены и 227 полиморфных сайтов, 161 (19.1%) замена филогенетически информативная. Из 280 кодируемых аминокислотных остатков 21 переменный. Для гена *16S* рРНК (612 пн) идентифицировано 58 нуклеотидных замен и 51 полиморфный сайт, 34 (5.6%) замены филогенетически информативные.

Показатели генетической изменчивости *C. kolymensis* следующие. Для гена *COI* обнаружено четыре нуклеотидных замены и четыре филогенетически информативных сайта. Для гена цитохрома *b* обнаружено четыре нуклеотидных замены и четыре филогенетически информативных сайта; одна замена аминокислотных остатков. Для гена *16S* рРНК обнаружено две нуклеотидные замены и два филогенетически информативных сайта. У колымского подкаменщика выявлено четыре гаплотипа.

Во всех исследованных генах обнаружены мутации, маркирующие *C. kolymensis* и отличающие его от других видов рода *Cottus*: 7, 3 и 2 замены

нуклеотидов для генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК. В соответствии с данными табл. 2 значения ML-дистанций между мтДНК *C. kolymensis* и внешней группы варьируют от 10.79% (*C. kolymensis*/*Mesocottus haitej*) до 14.27% (*C. kolymensis*/*Trachidermus fasciatus*). Между *C. kolymensis* и другими видами рода *Cottus* минимальное значение составило 4.64% (с *C. czerskii*), максимальное — 9.56% (с *C. hangiongensis*). Генетические дистанции между *C. kolymensis* и видами группы “*Cottus poecilopus*” (*C. szanaga*, *C. poecilopus*, *C. volki*, исключая *C. koreanus*) варьируют от 4.73 до 6.27%.

По данным об объединенных последовательностях мтДНК *C. kolymensis* реконструировано UPGMA-дерево (рис. 1), которое включает три кластера: Kol (экземпляры из озер бассейна р. Колыма), Okh1 (экземпляры из бассейна Охотского моря — р. Дукча, озер Чистое и Глухое), Okh2 (экземпляры из бассейна Охотского моря — р. Кульки). Все узлы ветвления поддержаны достоверными значениями бутстрэп-оценок ($\geq 70\%$).

По данным об объединенных последовательностях мтДНК видов рода *Cottus* реконструировано байесовское филогенетическое дерево (рис. 2). В основании дерева находятся ДНК видов внешней группы. Виды рода *Cottus* разделяются на три кластера: А (*C. amblystomopsis* Schmidt, 1904, *C. hangiongensis* Mori, 1930, *C. koreanus*), В (*C. asper* Richardson, 1836, *C. dzungaricus* Kottelat, 2006, *C. perifretum* Freyhof, Kottelat et Nolte, 2005, *C. rhenanus* Freyhof, Kottelat et Nolte, 2005, *C. bairdii* Girard, 1850, *C. cognatus*), С (*C. volki*, *C. poecilopus*, *C. czerskii* Berg, 1913, *C. szanaga*, *C. kolymensis*). Оценки апостериорной вероятности ($PP \geq 0.95$) подтверждают достоверность ассоциаций типов ДНК.

Кариологический анализ

На основании анализа 350 рутинно окрашенных метафазных пластинок установлены два цитотипа вида *C. kolymensis*.

Цитотип I — $2n = 48$, NF = 58 (рис. 3,а), обнаружен у четырех (три самки, один самец) экземпляров. В него входили двуплечие хромосомы: два средних метацентрика (пара 1); четыре крупных (пары 2, 3), два средних (пара 4) и два мелких (пара 5) субметацентрика. Одноплечие хромосомы в нем представлены тридцатью субтелоцентриками (пары 6–20) и 8 акроцентриками (пары 21–24).

Цитотип II — $2n = 48$, NF = 56 (рис. 3,б), выявлен у трех (два самца, одна самка) экземпляров. Он включал два средних метацентрика (пара 1), два крупных (пара 2), два средних (пара 3) и два мелких (пара 4) субметацентрика, тридцать два субтелоцентрика (пары 5–20) и восемь акроцентрических хромосом (пары 21–24).

Метацентрики (рис. 3,а, б: пара 1), субметацентрики (рис. 3,а: пары 2, 3, 4, 5; б: пары 2, 3, 4),

Таблица 2. Значения ML-дистанций (в %) по данным о нуклеотидных последовательностях участков генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК видов рода *Cottus* и внешней группы

Вид (ваучерный номер, номер в GenBank)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. <i>Cottus kotymensis</i> (2222)																			
2. <i>C. kotymensis</i> (2250)	0.29																		
3. <i>C. kotymensis</i> (2286)	0.42	0.13																	
4. <i>C. szanaga</i> (NC032039)	4.73	4.78	4.82																
5. <i>C. czerskii</i> (NC025242)	4.69	4.64	4.69	1.40															
6. <i>C. poecilopus</i> (MW448544)	5.50	5.36	5.50	3.90	3.86														
7. <i>C. volki</i> (NC035001)	6.27	6.13	6.18	6.97	6.83	6.97													
8. <i>C. periphetum</i> (MF326940)	7.35	7.44	7.59	7.48	7.28	7.54	8.02												
9. <i>C. dzungaricus</i> (MH638324)	7.39	7.49	7.64	7.48	7.24	7.54	7.69	1.57											
10. <i>C. cognatus</i> (2291)	7.61	7.76	7.81	7.46	7.08	7.75	7.57	4.44	4.49										
11. <i>C. cognatus</i> (2290)	7.66	7.81	7.86	7.51	7.13	7.80	7.62	4.49	4.54	0.13									
12. <i>C. cognatus</i> (MW856888)	8.00	8.14	8.19	7.60	7.22	8.04	7.57	4.81	4.72	3.05	3.14								
13. <i>C. asper</i> (MF326939)	7.38	7.34	7.48	7.61	7.14	7.57	7.25	5.55	5.33	5.73	5.78	6.24							
14. <i>C. rhenanus</i> (MF326941)	7.58	7.68	7.82	7.62	7.28	7.49	7.73	1.27	1.57	4.35	4.40	5.04	5.55						
15. <i>C. bairdii</i> (MW856840)	8.24	8.38	8.44	7.70	7.22	8.09	7.96	4.86	4.77	2.97	3.06	1.06	6.33	4.90					
16. <i>C. koreanus</i> (EU332750)	8.27	8.31	8.36	8.75	8.69	9.33	8.63	8.59	8.63	8.04	8.09	8.23	7.86	8.58	8.43				
17. <i>C. amblystomopsis</i> (NC035002)	9.03	9.12	9.08	9.22	9.23	9.31	8.88	9.36	9.46	9.25	9.30	10.14	8.72	9.40	10.00	8.49			
18. <i>C. hangjongsensis</i> (NC014851)	9.46	9.51	9.56	10.04	9.85	9.90	9.37	9.56	9.40	9.05	9.15	9.48	8.84	9.30	9.59	6.57	9.90		
19. <i>Mesocottus haitei</i> (KF170218)	10.79	10.79	10.94	11.24	11.24	11.28	10.89	10.99	11.01	11.48	11.54	11.75	10.74	10.79	11.70	11.45	12.38	11.86	
20. <i>Trachidermus fasciatus</i> (JX017305)	14.27	14.06	14.12	14.23	14.67	14.33	14.31	15.07	15.00	14.63	14.69	15.18	14.18	14.56	15.19	15.52	14.67	15.55	15.38

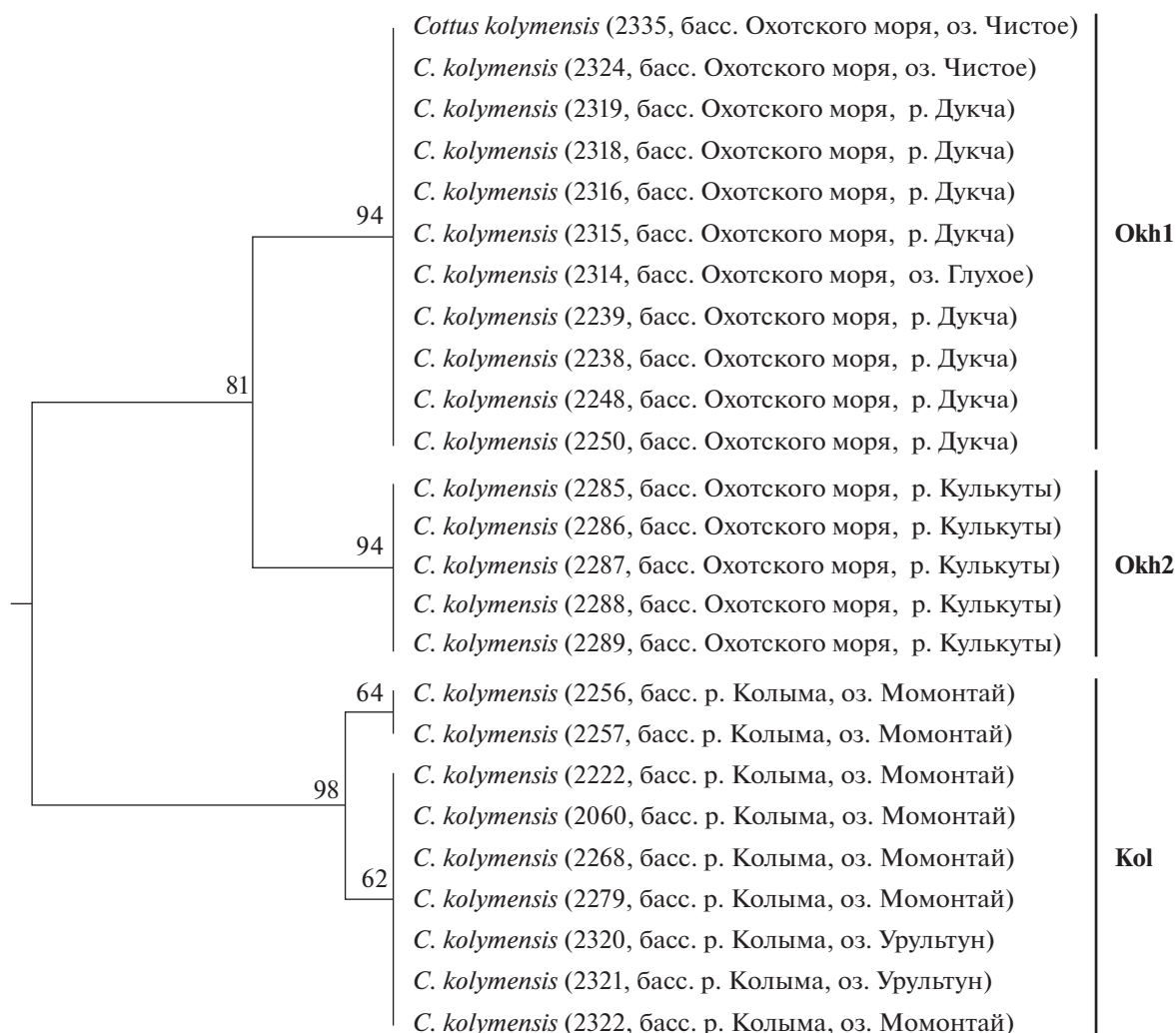


Рис. 1. UPGMA-дерево *Cottus kolymentis* по данным об объединенных последовательностях генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК митохондриального генома. Числа в основаниях кластеров – бутстрэп-поддержки (в % от 10 000 реплик). В скобках приведены ваучерные номера и район сбора экземпляров вида. Okh1 и Okh2 Kol – внутривидовые группы.

крупные субтелоцентрики (рис. 3, а: пары 6, 7; б: пары 5, 6) и акроцентрики (рис. 3, а, б: пара 21), всегда хорошо идентифицируемые во всех метафазных пластинках, рассматриваются нами как маркерные для обоих обнаруженных цитотипов. Изменчивость по числу хромосом не установлена, различий между кариотипами самцов и самок вида по $2n$ и NF не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Внутривидовая изменчивость *Cottus kolymentis*

В настоящей работе исследована выборка *C. kolymentis*, которая включает рыб из шести популяций, населяющих водоемы бассейна северной части Охотского моря и бассейна р. Колымы. Результаты молекулярно-генетического анализа свидетельствуют о генетической неоднородно-

сти вида. Наблюдаемая изменчивость обусловлена различиями между экземплярами колымского подкаменщика, выловленными как в относительно близких (озера и реки охотоморского бассейна), так и в удаленных (охотоморский и колымский бассейны) частях ареала. В нуклеотидных последовательностях генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК обнаружены замены, объединяющие *C. kolymentis* в три группы – колымскую Kol (озера Момотай и Урультун, бассейн р. Колыма), охотоморскую Okh1 (озера Чистое и Глухое, р. Дукча, бассейн Охотского моря) и охотоморскую Okh2 (р. Кулькуты, бассейн Охотского моря). В одном из самых эволюционно-консервативных в митохондриальном геноме гене *16S* рРНК, изменчивость которого может свидетельствовать о давней дивергенции, установлены 2 нуклеотидные замены, маркирующие группы Kol и Okh.

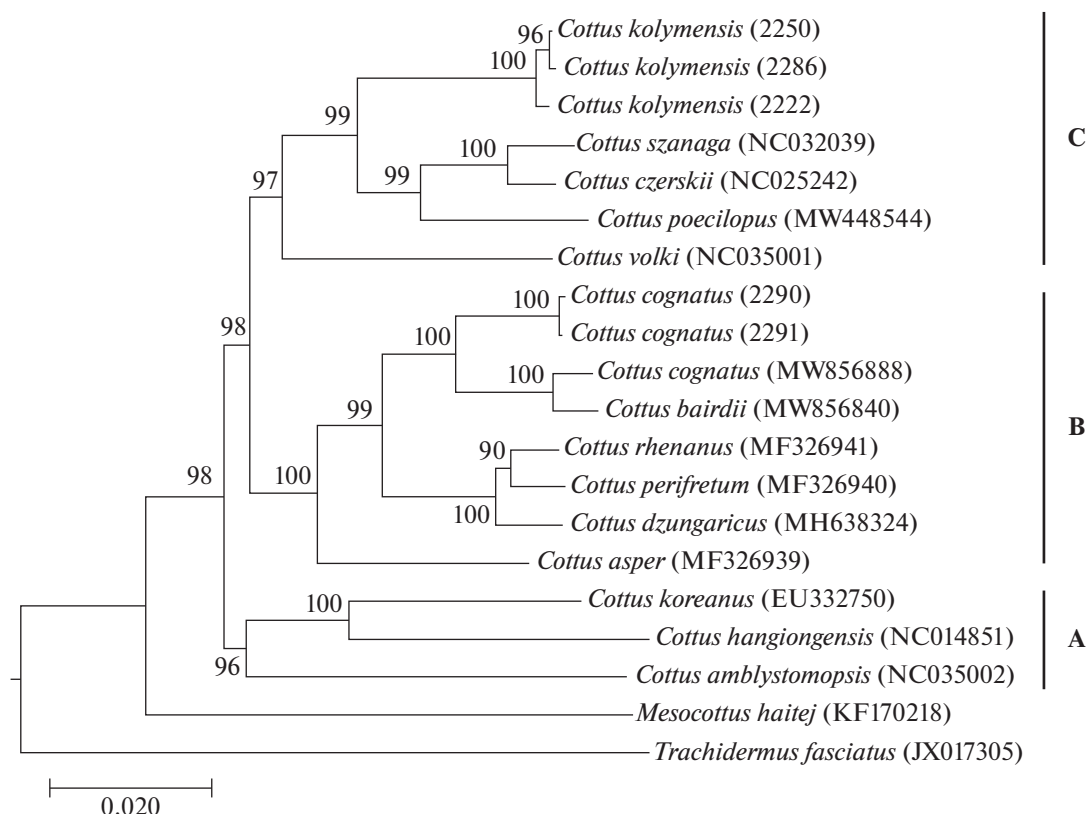


Рис. 2. Байесовское дерево видов рода *Cottus* по данным об объединенных последовательностях генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК митохондриального генома. Числа в основаниях кластеров — оценки апостериорной вероятности (в %). Рядом с названиями видов приведены ваучерные номера (в скобках) и номера в GenBank. А, В и С — филогенетические группы.

В целом число обнаруженных у *C. kolymensis* вариабельных сайтов составило 0.4, 0.5 и 0.3% для генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК соответственно. Такие значения являются очень низкими в сравнении с уровнями межвидовой дивергенции в семействе Cottidae, установленными, например, для нуклеотидных последовательностей тех же участков мтДНК видов рода *Gymnancistrus* (7.7, 8.4 и 11.9% для генов *COI*, *12S*–*16S* рРНК и цитохрома *b*) [28].

Ранее на основе сравнительного анализа разных участков мтДНК были предложены пороговые значения внутривидовых и межвидовых генетических дистанций для представителей рода *Cottus* [29, 30]. Например, для участка гена *COI* таким критерием являются не более 1% различий между популяциями одного вида и 5–8% различий между видами. Полученные в настоящей работе ML-дистанции между последовательностями гена *COI* групп колымского подкаменщика не превышают внутривидовых различий — 0.11% (Okh1/Okh2), 0.32% (Okh1/Kol), 0.43% (Okh2/Kol). Анализ объединенных нуклеотидных последовательностей генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК также показывает невысокие различия групп *C. kolymensis* из

разных частей ареала — 0.13% (Okh1/Okh2), 0.28% (Okh1/Kol), 0.41% (Okh2/Kol).

Топология UPGMA-дерева (рис. 1) подтверждает подразделенность колымского подкаменщика в соответствии с географической приуроченностью к определенному месту обитания, с одной стороны, и невысокий уровень генетических различий, с другой. В структуре дерева выделяются три кластера: Kol (озера Момонтай и Урультун, бассейн р. Колыма), Okh1 (озера Чистое и Глухое, р. Дукча, бассейн Охотского моря) и Okh2 (р. Кулькуты, бассейн Охотского моря).

Данные кариологического анализа подтверждают внутривидовую неоднородность *C. kolymensis* и разделение его на группы. Колымский подкаменщик в отличие от большинства исследованных видов, хромосомные наборы которых стабильны, обладает изменчивостью числа хромосомных плеч (рис. 3; табл. 3). Сходные различия хромосомных наборов присутствуют у экземпляров *C. gobio* и *C. hangiongensis* из разных участков ареала [20, 22, 25, 26]. В соответствии с топологией UPGMA-дерева (рис. 1) наблюдаемая изменчивость обусловлена различиями между экземплярами вида из кластеров Okh1 (р. Дукча — цитотип I) и Okh2 (цитотип II).

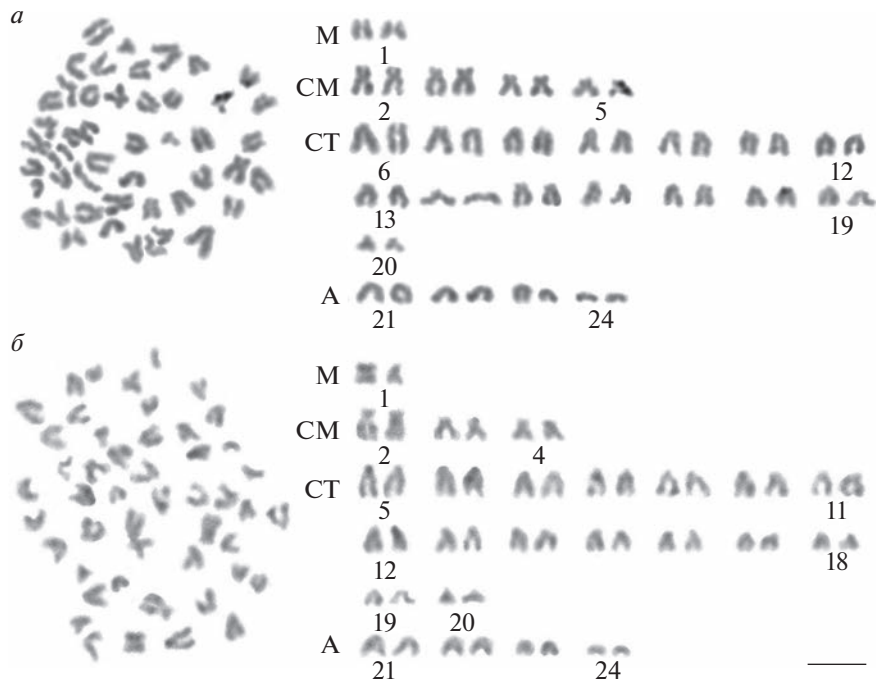


Рис. 3. Метафазные пластинки и кариогаммы *C. kolymensis* из: *a* – р. Дукча, $2n = 48$, $NF = 58$; *б* – р. Кулькуты, $2n = 48$, $NF = 56$. М – мета-, СМ – субмета-, СТ – субтело-, А – акроцентрические хромосомы; цифры – порядковые номера пар хромосом в кариогамме. Масштабная линейка: 10 мм.

Цитотипы колымского подкаменщика имеют одинаковое число хромосом, сходные маркерные хромосомы. Оба цитотипа содержат четыре пары А-хромосом (рис. 3). Однако в отличие от цитотипа I ($NF = 58$) в цитотипе II отсутствует пара крупных субметацентриков (рис. 3, *a*: пары 2, 3; *б*: пара 2), а в ряду субтелоцентриков содержится на одну пару хромосом больше (цитотип I – 15, цитотип II –

16). Обнаруженные различия позволяют предположить, что в одной из пар крупных субметацентриков в цитотипе II произошла перичентрическая инверсия, следствием которой стало уменьшение числа хромосомных плеч (56) в этом цитотипе. Реальность такого механизма хромосомной перестройки у колымского подкаменщика подтверждают различия по NF кариотипов изученных

Таблица 3. Основные признаки кариотипов видов рода *Cottus*

Вид	Число хромосом ($2n$)	Хромосомная формула	Число хромосомных плеч (NF)	Публикации
<i>C. cognatus</i>	48	24M/CM+24CT/A	72	[25]
<i>C. bairdii</i>	48	24M/CM+24CT/A	72	[25]
<i>C. reinii</i>	48	12M/CM+36CT/A	60	[19]
<i>C. gobio</i>	48	10M/CM+38CT/A	58	[23]
<i>C. gobio</i>	48	6M/CM+42CT/A	54	[20]
<i>C. gobio</i>	52	6M/CM+46CT/A	58	[17]
<i>C. nozawae</i>	48	10M/CM+38CT/A	58	[18]
<i>C. pollux</i>	48	10M/CM+38CT/A	58	[19, 22]
<i>C. poecilopus</i>	48	8M/CM+40A	56	[17]
<i>C. hangiongensis</i>	48	6M/CM+42CT/A	54	[18]
<i>C. hangiongensis</i>	48	4CT+44T	52	[24]
<i>C. koreanus</i>	48	4CT+44T	52	[24]
<i>C. paulus pygmaensis</i> (<i>C. paulus</i>)	48	—	48	[21]

видов рода *Cottus*, обусловленные именно периферическими инверсиями [27].

Генетический полиморфизм *C. kolymensis*, его дифференциация на внутривидовые группы в зависимости от мест обитания, вероятно, связаны с различными темпами и направлениями эволюционных процессов в условиях географической изоляции и экологических особенностей разных биотопов. Ранее на основе сравнительного анализа было высказано мнение, что морфологическая неоднородность видов группы “*Cottus poecilopus*” может быть связана с тем, что заселение исходных форм современных пресноводных подкаменщиков в реки осуществлялось в разное время и неоднократно [2]. Исходя из имеющейся информации, можно предположить, что обнаруженные генетические отличия экземпляров колымского подкаменщика из р. Дукча, озер Чистое и Глухое, р. Кулькуты и озер колымского бассейна возникли вследствие разного времени заселения в них представителей вида и, учитывая гидрологические особенности водоемов, последующей длительной географической изоляции популяций.

Дифференциация *Cottus kolymensis*, видов группы “*Cottus poecilopus*” и остальных видов рода *Cottus*

Среди 68 видов рода *Cottus* [31] только для 13 получены последовательности полных митохондриальных геномов (*C. czerskii*, *C. volki*, *C. amblystomopsis*, *C. hangiongensis*, *C. dzungaricus*, *C. asper*, *C. perifretum*, *C. rhenanus*, *C. cognatus*, *C. koreanus*, *C. poecilopus*, *C. szanaga*, *C. bairdii*), все они использованы в нашем исследовании для сравнительного анализа. Из-за отсутствия в GenBank последовательностей генов *COI*, цитохрома *b*, *16S* рРНК *C. altaicus* и *C. kuznetzovi*, не удалось привлечь в анализ эти виды. Тем не менее полученные молекулярно-генетические данные подтверждают существование в пределах рода *Cottus* отдельной группы “*Cottus poecilopus*”, в которую входят таксоны видового ранга. Однако состав входящих в нее видов отличается от предложенного другими авторами. Судя по ML-дистанциям, к видовой группе “*Cottus poecilopus*” следует отнести *C. czerskii* и исключить из нее *C. koreanus*.

Группа “*Cottus poecilopus*” в составе *C. poecilopus*, *C. szanaga*, *C. volki*, *C. czerskii*, *C. kolymensis* характеризуется маркерными заменами нуклеотидов в генах цитохрома *b* (четыре замены) и *16S* рРНК (две замены), отличающимися их от других изученных видов рода *Cottus*. Уровень различий в пределах группы варьирует от 1.4% между *C. szanaga* и *C. czerskii* до 6.97% между *C. volki* и *C. szanaga*, а также между *C. volki* и *C. poecilopus*. Среднее значение ML-дистанций составляет 5.37% (табл. 2).

C. czerskii, которого на основе морфологических данных не относят к группе “*Cottus poecilopus*”

”, а сближают с *C. hangiongensis* [32], по молекулярно-генетическим данным наиболее близок к *C. szanaga* (1.4%) и *C. poecilopus* (3.86%) и значительно отличается от *C. hangiongensis* (9.85%). Напротив, *C. koreanus* на основе морфологических признаков относят к группе “*Cottus poecilopus*” [3], но по данным изучения контрольного региона мтДНК он наиболее близок к *C. hangiongensis* [8]. По нашим данным *C. koreanus* отличается от видов группы “*Cottus poecilopus*” так же, как от остальных изученных видов *Cottus* — в среднем на 8.62 и 8.15% соответственно. При этом значение ML-дистанции между *C. koreanus* и *C. hangiongensis* минимальное, составляет всего 6.57% (табл. 2).

Виды группы “*Cottus poecilopus*” значительно дифференцированы от других видов рода *Cottus*: ML-дистанции варьируют от 7.13% между *C. czerskii* и *C. cognatus* до 10.04% между *C. szanaga* и *C. hangiongensis* и составляют в среднем 8.1%. В сравнении со средним значением ML-дистанций в пределах группы (5.37%), с одной стороны, и со средним значением ML-дистанций между видами рода *Cottus* и внешней группой (11.27% с *Mesocottus haitej* и 14.68% с *Trachidermus fasciatus*), с другой стороны, такой уровень генетических отличий (8.1%) подтверждает существование в роде *Cottus* отдельной видовой группы “*Cottus poecilopus*”.

В пределах группы “*Cottus poecilopus*” самыми близкими видами к колымскому подкаменщику являются *C. czerskii* (среднее значение ML-дистанций составляет 4.67%) и *C. szanaga* (4.78%). Более всего *C. kolymensis* дифференцирован от *C. volki* (6.19%). *C. kolymensis* и виды рода *Cottus*, не входящие в группу “*Cottus poecilopus*”, отличаются гораздо больше — от 7.46% с *C. perifretum* до 9.51% с *C. hangiongensis*, среднее значение ML-дистанций составляет 8.08%.

Цитогенетическими методами род *Cottus* изучен крайне слабо. Кариотипированы только 10 его представителей [33] (табл. 3). Среди них *C. poecilopus* и *C. koreanus*, которые так же, как и исследованный вид *C. kolymensis*, входят в состав группы “*Cottus poecilopus*” [1]. В ходе сравнительного анализа установлено, что кариотипы *C. kolymensis* и других изученных видов рода, за исключением *C. gobio* [19], имеют одинаковое число хромосом (рис. 3, табл. 3). Объяснить возникновение отличий хромосомного набора *C. gobio* по $2n$ от кариотипов других исследованных представителей *Cottus* не представляется возможным из-за низкого качества представленных в работе метафазной пластинки и кариограммы. Н. Ида с соавт. (1989) было высказано предположение о неверной идентификации изученных экземпляров [24]. Основные признаки хромосомных наборов *C. kolymensis* (цитотип I) и видов *C. gobio*, *C. nozawae*, *C. pollux* сходны по числу, морфологии хромосом и числу хромосомных плеч (рис. 3; табл. 3). Однако другие изу-

ченные виды подкаменщиков отличаются не только от них, но и друг от друга по количественному соотношению двуплечих (М/СМ) и одноплечих (СТ/А) хромосом и, как следствие, по числу хромосомных плеч (табл. 3). Возникновение обнаруженных различий, по мнению специалистов, объяснимо тем, что эволюция кариотипов видов рода *Cottus* происходила путем перичентрических инверсий [27].

Родственные связи *Cottus kolyomensis*

На филогенетическом дереве (рис. 2) мтДНК колымского подкаменщика находится в кластере С, объединяющем виды группы “*Cottus poecilopus*”. В основании этого кластера расположен *C. volki*. Затем следует микрокластер, включающий виды (*C. szanaga* + *C. czerskii*) + *C. poecilopus*, к которым присоединяется *C. kolyomensis*. Топология байесовского дерева с высокой достоверностью подтверждает существование видовой группы “*Cottus poecilopus*”, в состав которой входят *C. poecilopus*, *C. szanaga*, *C. volki*, *C. czerskii*, *C. kolyomensis*. Терминальное положение кластера С предполагает недавнюю дивергенцию группы “*Cottus poecilopus*”. МтДНК *C. koreanus*, включенного ранее в эту группу видов, попадает в кластер А вместе с *C. hangiongensis* и *C. amblystomopsis*. Базальное положение кластера А предполагает раннюю дивергенцию и близость к предковой форме видов *C. koreanus*, *C. hangiongensis* и *C. amblystomopsis*.

Сравнительный анализ результатов настоящей работы и других молекулярно-генетических исследований видов рода *Cottus* показывает значительное совпадение данных. В одном из последних исследований, которое включает большинство полных митохондриальных геномов видов рода из GenBank, NJ филогенетическое дерево ([34]: Figure 2) имеет сходную топологию. У основания дерева находится линия В в составе *C. hangiongensis*, *C. amblystomopsis*, *C. reinii*, *C. poecilopus* (= *C. koreanus* в соответствии с номером в GenBank EU332750). Линия А1 включает виды группы “*Cottus poecilopus*”: близкие *C. szanaga* и *C. czerskii*, а также *C. volki*. Линия А2 представлена *C. rhenanus*, *C. perifretum*, *C. dzungaricus*. По мнению авторов, в роде *Cottus* виды линии В дивергировали раньше, а виды линий А1 и А2 позже.

В нашем исследовании впервые проведен анализ кариотипа *C. kolyomensis*, который показал, что хромосомные наборы этого вида и подкаменщиков рода *Cottus* имеют общие признаки, указывающие на их таксономическую близость. Впервые проведен анализ изменчивости генов *COI*, цитохрома *b* и *16S* рРНК мтДНК *C. kolyomensis*, подтверждающий видовой статус колымского подкаменщика. Впервые изучены представители вида из озер бассейна р. Колымы. Выявлен комплекс кариологических и молекулярно-генетических мар-

керных признаков, позволяющих идентифицировать *C. kolyomensis*. Установлены различия цитотипов экземпляров колымского подкаменщика из р. Дукча и р. Кулькuty, которые могли возникнуть вследствие разного времени заселения представителей вида в эти реки, последующей географической изоляции популяционной группировки вида из р. Кулькuty. Обнаружены генетические различия популяций *C. kolyomensis*, населяющих водоемы бассейнов р. Колымы и северной части Охотского моря, на основании которых вид подразделяется на три группы в соответствии с местом обитания. На основе молекулярно-генетических данных подтверждено существование видовой группы “*Cottus poecilopus*” и принадлежность к ней вида *C. kolyomensis*. В противоположность данным морфологических исследований мы предлагаем включить в состав группы “*Cottus poecilopus*” вид *C. czerskii* и вывести из нее вид *C. koreanus*.

Авторы благодарны к.б.н. Сергею Грунину (ИБПС ДВО РАН), к.б.н. Елене Хаменковой (ИБПС ДВО РАН), Виталию Поспехову (ИБПС ДВО РАН) за помощь в сборе материала.

Работа выполнена при бюджетной поддержке в рамках НИР “Фауна, систематика и экология морских и пресноводных гидробионтов Северо-Востока России” (Российская Федерация, № 0290-2019-0004), Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Россия.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сиделева В.Г., Гомо А. Новый вид подкаменщика *Cottus kolyomensis* sp. nova (Scorpaeniformes: Cottidae) из рек Колымского края // Вопр. ихтиологии. 2012. Т. 52. № 3. С. 288–294. <https://doi.org/10.1134/S0032945212020130>
2. Черешнев И.А. Подкаменщик рода *Cottus* (Cottidae) из бассейна реки Чаун (арктическая Чукотка) // Вопр. ихтиологии. 1982. Т. 22. № 1. С. 15–26.
3. Сиделева В.Г., Гомо А. Видовой статус и переописание трех видов группы *Cottus poecilopus* (Cottidae) Евразии // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49. № 5. С. 617–631.
4. Парин Н.В., Евсеенко С.А., Васильева Е.Д. Рыбы морей России: аннотированный каталог. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2014. 733 с.
5. Токранов А.М., Липнягов С.В., Ким О.О. Подкаменщик рода *Cottus* Linnaeus (Cottidae) из бассейна р. Ука (Северо-Восток Камчатки) // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. Вып. 8. Владивосток: Дальнаука, 2019. С. 166–174. <https://doi.org/10.25221/levanidov.08.17>

6. Богданов Б.Э., Свердлова Т.В., Книжнин И.Б. Изменчивость и таксономический статус сибирских популяций пестрогого подкаменщика *Cottus poecilopus* complex (Scorpaeniformes: Cottidae) // Журн. Сиб. федерального ун-та. Биология. 2013. Т. 6. № 1. С. 18–31.
7. Кириллов А.Ф., Ансолихова О.Д., Журков Ф.Н. и др. Аннотированный список рыбообразных и рыб бассейна Восточно-Сибирского моря // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и Северо-Западной части Тихого океана. 2016. Вып. 42. С. 78–87.
<https://doi.org/10.15853/2072-8212.2016.42.78-87>
8. Yokoyama R., Sideleva V.G., Shedko S.V., Goto A. Broad-scale phylogeography of the Palearctic freshwater fish *Cottus poecilopus* complex (Pisces: Cottidae) // J. Mol. Phylog. Evol. 2008. V. 48. P. 1244–1251.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.02.002>
9. 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>
10. Черешнев И.А., Шестаков А.В., Скопец М.Б. Определитель пресноводных рыб Северо-Востока России. В.: Дальнаука, 2001. 129 с.
11. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1982. 480 p.
12. 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>
13. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Levan A., Fredga K., Sandberg A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // Hereditas. 1964. V. 52. P. 201–220.
19. Starmach J. Die Chromosomen von *Cottus poecilopus* Heckel und *Cottus gobio* L. // Acta Hydrobiol. 1967. V. 9. P. 301–307.
20. Abe S. Notes on the chromosomes of two species of fresh-water cottid fishes // Chromosome Inform. Service. 1972. V. 13. P. 25–27.
21. Abe S. A cytotaxonomical study in some freshwater cottid fishes (Cottidae, Pisces) // Cytologia. 1976. V. 41. P. 323–329.
22. Berberović L.J., Sofradžija A., Vagner L.J. The chromosomes of the species *Cottus gobio* L. (Cottidae, Pisces) // Got. Biol. Inst. Univ. Sarajevu. 1978. V. 27. P. 5–15.
23. Gold J.R., Karel W.J., Strand M.R. Chromosome Formulae of North American Fishes. Texas A & M Univ. System, 1979. 24 p.
24. Ida H., Terashima H., Fujimi T. Karyotypes in four species of the family Cottidae // Japan J. Ichthyol. 1989. V. 36. P. 135–140.
<https://doi.org/10.1007/BF02905683>
25. Vitturi R., Rasotto M.B. Karyotype analysis of *Cottus gobio* L. (Pisces, Cottidae) // Cytobios. 1990. V. 62. P. 81–86.
26. Park G.M., Song H.B. Karyotypes of five species in Odontobutidae and Cottidae of Korea // Kor. J. Ichthyol. 2006. V. 18. P. 155–162.
27. Thompson K., Whitcomb S., Choudhry E. et al. Karyotypes of *Cottus cognatus*, *C. bairdi*, and their hybrids in central Pennsylvania // J. Pennsylvania Acad. Sci. 2020. V. 93. № 1. P. 37–46.
<https://doi.org/10.5325/jpennacadsci.93.1.0037>
28. Yamazaki A., Markevich A., Munehara H. Molecular phylogeny and zoogeography of marine sculpins in the genus *Gymnocanthus* (Teleostei; Cottidae) based on mitochondrial DNA sequences // Mar. Biol. 2013. V. 160. P. 2581–2589.
<https://doi.org/10.1007/s00227-013-2250-4>
29. Kontula T., Kirilchik S.V., Väinölä R. Endemic diversification of the monophyletic cottoid fish species flock in Lake Baikal explored with mtDNA sequencing // Mol. Phylog. Evol. 2003. V. 27. P. 143–155.
[https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(02\)00376-7](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(02)00376-7)
30. Ao M., Xie P., Zhao G. et al. The complete mitochondrial genome of *Cottus sibiricus altaicus* (Scorpaeniformes: Cottidae) // Mitochondrial DNA. 2016. V. 27. № 2. P. 1315–1316.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2014.945573>
31. 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 April 01, 2022.
32. Савельев П.А., Колпаков Е.В. Морфологическое описание, внутривидовая изменчивость и родственные связи подкаменщика Черского *Cottus czerskii* (Cottidae) // Вопр. ихтиологии. 2018. Т. 58. № 2. С. 144–153.
<https://doi.org/10.7868/S0042875218020030>
33. Arai R. Fish Karyotypes. A Check List. Tokyo; Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 2011. 347 p.
<https://doi.org/10.1007/978-4-431-53877-6>
34. Yang T., Meng W., Xuhui W. et al. The complete mitochondrial genome of endemic freshwater sculpin *Cottus dzungaricus* (Scorpaeniformes: Cottidae) revealed by high-throughput NGS: Genome structure and its phylogenetic relationships // Turkish J. Fish. Aquat. Sci. 2020. V. 20. № 1. P. 29–37.
https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_1_03

**Genetic Differentiation and Relationships *Cottus kolyensis*
Sideleva et Goto, 2012 (Cottidae)**

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

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

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

**e-mail: mradchenko@mail.ru*

For the first time, a karyological and molecular genetic (*COI*, cytochrome *b*, *16S* rRNA genes) study of the freshwater fish species *Cottus kolyensis*, recently described from the Dukcha and Kolyma rivers in northeast Asia, was carried out. A complex of karyological and molecular-genetic marker traits has been determined to identify the species. Genetic differences between the populations of *C. kolyensis* inhabiting the water bodies of the river basins of Kolyma and the northern part of the Sea of Okhotsk were found. On their basis the species is divided into groups in accordance with the habitat. The existence of a separate group "*Cottus poecilopus*" within the genus *Cottus*, which includes taxa of the species rank, including *C. kolyensis*, has been confirmed.

Keywords: cottid fishes, karyotype, marker chromosomes, mitochondrial DNA (mtDNA), genes *COI*, cytochrome *b*, *16S* rRNA, molecular phylogeny, pericentric inversions.