

УДК 597.551.2.591.15.575.17

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ISSR-МАРКЕРОВ У ЩИПОВОК РОДА *COBITIS* (COBITIDAE) В СВЯЗИ С ПРОБЛЕМАМИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВИДОВ, УЧАСТВОВАВШИХ В ОБРАЗОВАНИИ ПОЛИПЛОИДНЫХ ФОРМ ГИБРИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СТАТУСА

© 2023 г. А. А. Волков¹, С. М. Расторгуев², Е. Д. Васильева³ *, В. П. Васильев⁴

¹Филиал по пресноводному рыбному хозяйству Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии – ВНИИПРХ, пос. Рыбное, Московская область, Россия

²Национальный исследовательский центр – Курчатовский институт, Москва, Россия

³Зоологический музей Московского государственного университета, Москва, Россия

⁴Институт проблем экологии и эволюции РАН – ИПЭЭ РАН, Москва, Россия

*E-mail: vas_katerina@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2022 г.

После доработки 22.07.2022 г.

Принята к публикации 16.09.2022 г.

Впервые проведённый анализ полиморфизма ISSR-фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции позволил успешно дифференцировать геномы щиповок, предположительно участвовавших в образовании полиплоидных форм гибридного происхождения: *Cobitis taenia*; щиповок из бассейна р. Дунай, диагностируемых как *C. elongatoides*; *C. tanaitica* из бассейна р. Дон и щиповок из оз. Синое, которых ряд авторов также относит к виду *C. tanaitica*. В результате сравнительных морфологических исследований ранее не дифференцируемых форм сделаны следующие выводы: 1) щиповки из Средней Европы с кариотипом $2n = 50$, $NF = 96$ соответствуют диагнозу вида *C. elongatoides*, от ряда близких видов и полиплоидных форм этот вид отличается также расположенным впереди основания брюшных плавников началом спинного плавника и наличием пятна в нижней половине основания хвостового плавника; 2) щиповки оз. Синое и другие популяции Средней Европы с кариотипом $2n = 50$, $NF = 86$ не конспецифичны *C. tanaitica* и, по-видимому, должны рассматриваться в ранге самостоятельного вида *C. megaspila*.

Ключевые слова: ISSR-полиморфизм, *Cobitis taenia*, *C. tanaitica* из р. Дон, *C. elongatoides*, *C. megaspila*.

DOI: 10.31857/S0042875223030244, **EDN:** BZGQQR

Исследования таксономии и филогенетических отношений щиповок рода *Cobitis* (Cobitidae) интенсивно ведут разные научные группы с 1980-х гг., когда было показано, что щиповки, относимые ранее к одному виду *C. taenia* Linnaeus, 1758 (Берг, 1949), в составе которого выделяли отдельные подвиды, на самом деле представлены целым рядом самостоятельных бисексуальных видов, а также полиплоидными однополюми формами разного происхождения (Васильев, Васильева, 1982; Vasil'ev et al., 1989, 2011; Васильева и др., 1989; Васильев и др., 1990, 2007; Ráb, Slavík, 1996; Boroń, Danilkiewicz, 1998; Boroń, Kotusz, 1999, 2000; Ráb et al., 2000; Šlechtová et al., 2000, 2003; Bohlen, Ráb, 2001; Bohlen et al., 2002; Межжерин, Чудакова, 2002; Lusk et al., 2003; Doadrio, Perdices, 2005; Janko et al., 2005a, 2005b, 2007, 2018; Majtánová et al., 2016). Эти исследования имеют большое значение не

только для выяснения таксономии и филогенетических отношений бисексуальных видов, но и в плане изучения происхождения полиплоидных форм рыб и механизмов полиплоидной эволюции позвоночных животных. Несмотря на значительный успех, достигнутый за прошедшие годы, ряд вопросов до сих пор нуждается в дальнейшем изучении. К таким проблемам относится выявление родительских видов обнаруженных полиплоидных форм, степени их родства и механизмов, обеспечивающих гибридизацию, а также условий сосуществования полиплоидных форм и родительских видов в пределах бисексуально-клональных или диплоидно-полиплоидных комплексов.

В настоящей работе представлены результаты молекулярно-генетического анализа и сравнительных морфологических исследований в группе диплоидных бисексуальных щиповок, морфологи-



Рис. 1. Места сбора материала: (●) – *Cobitis taenia*, (■) – *C. tanaitica*; реки: 1 – Западная Двина, 2 – Днепр, 3 – Дон.

чески сходных с видом *C. taenia*, которые ранее были предложены в качестве возможных предков ряда полиплоидных форм. Приведено обсуждение результатов в связи с таксономией и номенклатурой дискуссионных форм.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для молекулярно-генетического анализа использовали собранные авторами материалы (рис. 1), включающие подтвержденные кариологическими данными два вида щиповок, идентифицированных на основе диагностических морфологических характеристик (Васильева, 1984; Васильева, Васильев, 1998). Ваучерные экземпляры проб хранятся в коллекции Зоологического музея МГУ (ЗММУ): 1 – обыкновенная щиповка *C. taenia* из верховьев р. Днепр у д. Билино Смоленской обл., 55°13' с.ш., 33°29' в.д., 5 экз. (ЗММУ Р-21805, сборы 23.06.2006 г.) и из р. Западная Двина у г. Ве-

лиж, 55°36' с.ш., 31°12' в.д., 3 экз. (ЗММУ Р-21800, сборы 13.06.2005 г.); 2 – донская щиповка *C. tanaitica* Băcescu et Maier, 1969 из р. Дон у с. Донское Липецкой обл., 52°37' с.ш., 38°59' в.д., 8 экз. (ЗММУ Р-23353, сборы 30.06.2004 г.).

Ткани от свежих рыб, преимущественно грудные плавники, фиксировали 96%-м этиловым спиртом. Помимо собственных сборов использовали материалы, полученные от К. Янко (K. Janko) из Института физиологии и генетики животных, г. Либехов, Чешская Республика. Щиповки, от которых получены ткани для генетического анализа, были идентифицированы К. Янко как *C. elongatoides* Băcescu et Maier, 1969 (р. Комана, Румыния и р. Мур, Австрия) и *C. tanaitica* (оз. Синое, дельта р. Дунай, Румыния). Эти материалы использовали и для генетических исследований в Чехии (Janko et al., 2003, 2007).

Для анализа полиморфизма фрагментов ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) с помощью поли-

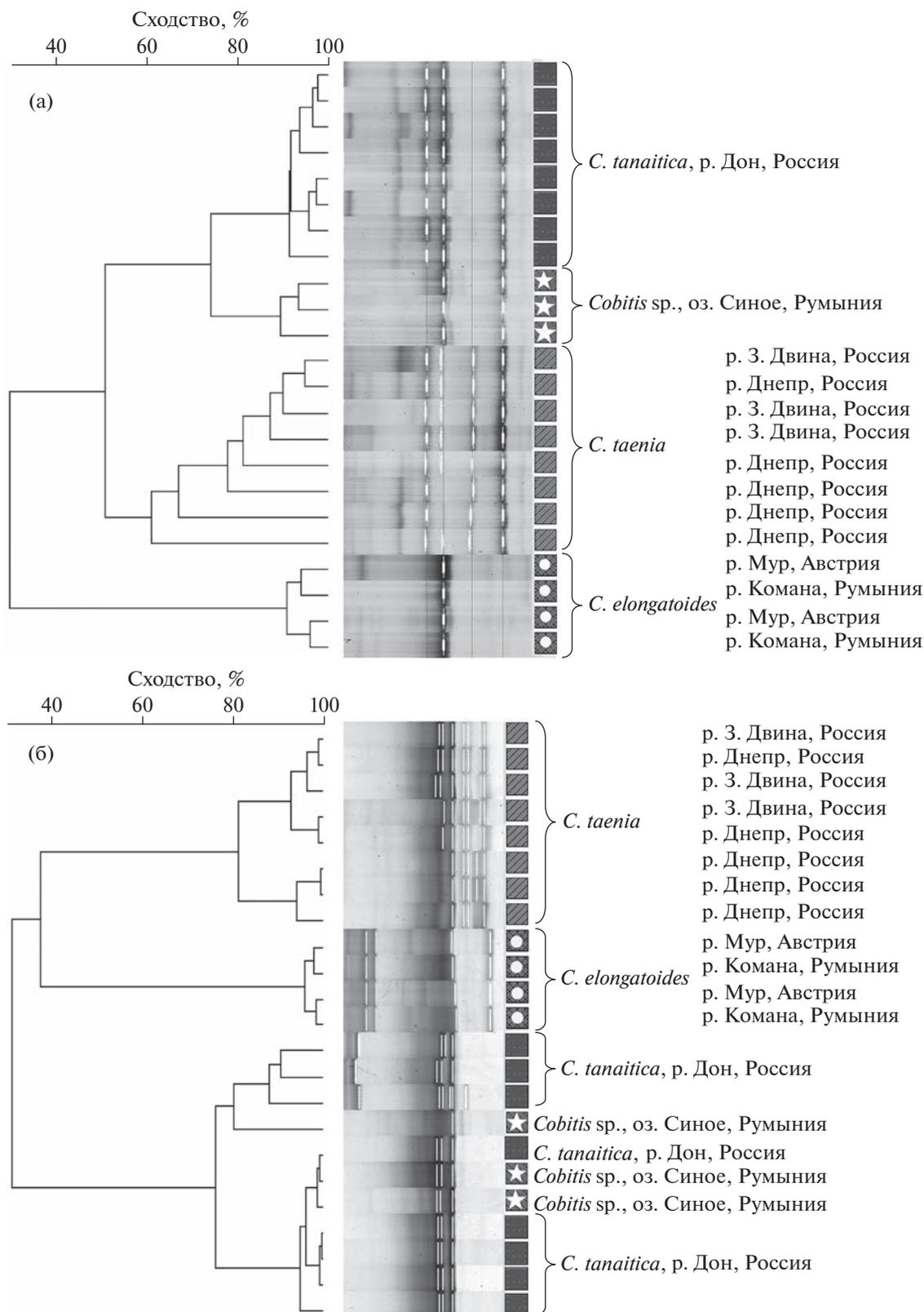


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма сходства–различия индивидуальных ISSR-спектров разных видов рода *Cobitis* для двух информативных праймеров: а – CA-RT, б – T-CA. На дорожках геля белыми штрихами выделены видоспецифичные фрагменты ДНК.

Одновременно результаты дают основание для решения ряда таксономических проблем в роде *Cobitis*. Как следует из полученных данных, щиповки из оз. Синое, хотя и наиболее близки к *C. tanaitica* из бассейна р. Дон, тем не менее чётко отличаются от них по молекулярным маркерам (праймер SA-RT). Следует указать, что это – не единственное отличие двух форм щиповок. Кариотип *C. tanaitica* из р. Дон (типичное местонахождение данного вида) характеризуется фиксированной У-аутосомной транслокацией – у самок число хромосом $2n = 50$ (8 мета- (m) + 28 субмета- (sm) + 14 субтелоцентрических (st)), у самцов – $2n = 49$ (9m + 28sm + 12st), число хромосомных плеч (NF) – 86 (Васильева, Васильев, 1998; приводится как *C. rossomeridionalis* Vasil'eva et Vasil'ev, 1998, который следует считать младшим синонимом *C. tanaitica*). Этот кариотип существенно отличается от кариотипа обыкновенной щиповки *C. taenia*, впервые описанного для популяции бассейна р. Волга (Васильева и др., 1989; Vasil'ev et al., 1989), а позднее обнаруженного и в других диплоидных популяциях щиповок, включая исследованных в данной работе щиповок из верховьев Днепра и Западной Двины (Васильев и др., 2007). В настоящее время кариотип обыкновенной щиповки с $2n = 48$, из которых 10 m, 18 sm и 20 субтело-acroцентрических (sta) хромосом, и NF = 76, служит надёжным маркером вида на всём ареале группы европейских близкородственных диплоидных видов и полиплоидных форм (таблица). Вторым маркерным для европейских видов щиповок является кариотип, впервые описанный для диплоидных щиповок из р. Пшовка в Чехии: $2n = 50$ (30m + 16sm + 2st + 2a), NF = 96 (Ráb, Slavík, 1996). Позднее было показано, что щиповки с таким кариотипом, идентифицируемые авторами как *C. elongatoides*, имеют широкий пан-Дунайский ареал и распространены также в бассейнах Балтийского и Северного морей (Boroń, Kotusz, 1999; Ráb et al., 2000), что было подтверждено и молекулярно-генетическими исследованиями (Janko et al., 2003, 2005a).

Что касается кариотипа щиповок из оз. Синое, то здесь следует отметить следующее. Впервые предположение о наличии кариотипа, похожего на кариотип *C. tanaitica*, у щиповок, обитающих к западу от бассейна р. Днестр, было сделано на основе изучения структуры кариотипов полиплоидных форм. Согласно этим исследованиям, геном триплоидных щиповок из бассейна р. Висла включает гаплоидный набор неизвестного вида, чей кариотип предположительно содержит 50 хромосом (12m + 24sm + 14st-a) (Boroń, Danilkiewicz, 1998) и похож на кариотип *C. tanaitica* (Boroń, Kotusz, 2000). Исходно к неизвестному виду *Cobitis* sp. относили и гаплоидный набор с 8m + 13sm-st + 4a, который был вычленен из генома триплоидной формы экземпляров из рек Дые (Dyje, средний

Дунай) и Морава (Ráb et al., 2000). В дальнейшем кариотип, выявленный в геномах данных триплоидов, был отождествлён с кариотипом *C. tanaitica* (Bohlen, Ráb, 2001; Bohlen et al., 2002). Эта точка зрения была принята во всех последующих публикациях по щиповкам Центральной Европы (Lusk et al., 2003; Šlechtová et al., 2003; Janko et al., 2007). Исходя из приведённых формул кариотипов триплоидов и *C. elongatoides*, возможны следующие варианты формулы кариотипа “*C. tanaitica*” из бассейна Дуная и вод Центральной Европы: $16m + 26sm-st + 8a$ (Ráb et al., 2000); $12m + 24sm + 14st-a$ (Boroń, Danilkiewicz, 1998); $10m + 22sm + 18st$ (Lusk et al., 2003). При таких формулах кариотипа NF может варьировать от 82 до 90.

Кариотип диплоидных щиповок из оз. Синое впервые был опубликован в 2007 г. (Janko et al., 2007). В соответствии с приведённой раскладкой (в тексте статьи в формуле кариотипа допущена ошибка), у “*C. tanaitica*” из водоёмов Центральной Европы 50 хромосом (10m + 26sm + 14sta) и NF = 90 (таблица). Этот кариотип в большей степени отличается от кариотипа *C. tanaitica* из бассейна Дона, чем представленные выше кариотипы, полученные путём вычленения кариотипа *C. elongatoides* из кариотипа триплоидной формы. Тем не менее, можно допустить, что все наблюдаемые различия в соотношении двуплечих и одноплечих хромосом в сравниваемых кариотипах могут быть обусловлены разной степенью спирализации хромосом в изученных авторами метафазах и различиями в классификации отдельных хромосом. Нельзя допустить лишь один важный момент. Приводя кариотип “*C. tanaitica*”, Янко с соавторами (Janko et al., 2007) подчёркивают, что биотип, соответствующий этому кариотипу, был обнаружен как у самцов, так и у самок щиповок из низовья Дуная, района Добруджа, верховья Одера и р. Дон. Такая попытка искусственно объединить щиповок Дона и Центральной Европы выглядит более чем некорректно.

Фиксированная У-аутосомная транслокация, выражающаяся в различиях числа хромосом у самцов и самок, является важнейшим диагностическим признаком *C. tanaitica* s. str. из бассейна Дона (см. выше). Различия в кариотипах самцов и самок *C. tanaitica* были получены на основании цитологического анализа 50 экз. из рек Дон, Обиточная, Бейсуг, Калка (бассейн Азовского моря), бассейнов рек Кубань, Днепр, Днестр и Южный Буг (Васильева, Васильев, 1998). Число кариотипированных щиповок из оз. Синое неизвестно, отождествление с ними особей из других локалитетов Центральной Европы осуществляли на основе аллозимного анализа (Bohlen, Ráb, 2001), результаты которого выглядят весьма противоречиво (Šlechtová et al., 2000; Janko et al., 2005b, 2007). В любом случае кариологические данные свидетельствуют о том, что щиповки оз. Синое не кон-

Кариотипы ряда европейских видов щиповок (род *Cobitis*) по данным разных авторов

Вид	Водная система	2n	Формула кариотипа	NF	Источник информации
<i>C. taenia</i>	Бассейн р. Волга	48	10m + 18sm + 20sta	76	Vasil'ev et al., 1989; Васильева и др., 1989
	Бассейн р. Буг, Польша	То же	То же	То же	Boroń, 1995
	Бассейн р. Одер	»	»	»	Boroń, Kotusz, 1999; Szlachciak, Boroń, 2003
<i>C. elongatoides</i>	Р. Везер, бассейн Северного моря	»	»	»	Ráb et al., 2000
	Оз. Клайнер-Плёнер-Зее, бассейн Балтийского моря	»	»	»	То же
	Бассейн р. Висла	»	»	»	Boroń, Daniłkiewicz, 1998; Szlachciak, Boroń, 2003
	Озёра на севере Польши	»	»	»	Ráb et al., 2000; Szlachciak, Boroń, 2003
	Водоёмы Великобритании	»	»	»	Boroń et al., 2003
	Руч. Пшовка, бассейн р. Эльба	50	30m + 16sm + 2st + 2a	96	Ráb, Slavík, 1996
	Р. Лужнице, бассейн р. Эльба	То же	То же	То же	Ráb et al., 2000
	Р. Дые, бассейн среднего Дуная	»	»	»	То же
	Район г. Бухарест	»	»	»	»
	Бассейн р. Одер	»	»	»	Boroń, Kotusz, 1999; Szlachciak, Boroń, 2003
<i>C. tanaítica</i>	Р. Ида, бассейн р. Тиса	»	30m + 16sm + 2st + 2a	»	Lusk et al., 2003
	Бассейны рек Дунай, Эльба, Одер, р. Камчия	»	22m + 26sm + 2st	98	Janko et al., 2007
	Бассейны рек Дон, Кубань, Днепр, Южный Буг, Днестр; рек бассейна Азовского моря	50♀ 49♂	8m + 28sm + 14st 9m + 28sm + 12st	86 То же	Васильев, 1995 (приводится как <i>Cobitis</i> sp.); Васильева, Васильев, 1998 (приводится как <i>C. rossomeridionalis</i>)
<i>C. tanaítica</i> *	Р. Дунай	50	10m + 22sm + 18a	82	Bohlen et al., 2002
	Реки Дунай, Одер, Дон; оз. Синое	То же	10m + 26sm + 14sta	86	Janko et al., 2007
	Р. Дунай, оз. Синое	»	То же	То же	Majtánová et al., 2016

Примечание. * Название вида дано в соответствии с цитируемыми публикациями. 2n – диплоидный набор хромосом; m, sm, st, sta, a – соответственно мета, субмета, субтело, субтело-акро и акроцентрические хромосомы; NF – число хромосомных плеч, ♀ – самка, ♂ – самец.

специфичны *C. tanaitica*, отличаются не только отсутствием У-аутосомной транслокации, но и формулой кариотипа (таблица): у них больше число метацентрических хромосом и меньше – субметацентрических. Основные места находок данного вида приурочены к нижнему течению Дуная (вблизи впадения притока Арджеш в Румынии и к юго-востоку от г. Видин в Болгарии) и черноморскому побережью близ его устьевой зоны на территории Румынии – помимо оз. Синое он указывается для озёр Хазарлак (Hazarlâc), Гиол (Ghiol) и Разим (Razim = Разелм) (Janko et al., 2007, 2018). Полиплоидные формы, в кариотипе которых обнаружен гаплоидный набор этого вида, также встречаются преимущественно в бассейне Дуная (Janko et al., 2007), поэтому пригодное название для него следует искать среди номинальных названий дунайских щиповок.

Ранее (Kottelat, 1997) для щиповок бассейна Дуная, у которых самцы имеют один орган Канестрины у основания грудного плавника, пригодными считали пять названий: *taenia*, *elongatoides*, *danubialis*, *megaspila* и *taenioides*. *C. taenia* – валидный вид, как отмечалось выше, характеризуется $2n = 48$ и, согласно современным данным, не встречается в бассейне Дуная. Название *elongatoides* было впервые предложено Бэческу (Băcescu, 1962) как инфраподвидовое *Cobitis taenia* var. *elongatoides* для щиповок Юго-Западной Румынии. Пригодным оно стало из последующей публикации Бэческу и Майера (1969), где используется как подвидовое. Проблема пригодности этого названия и включения в число его младших синонимов *C. taenia danubialis* Băcescu, 1993, предложенного в качестве замещающего названия (Nalbant, 1993), обсуждалась ранее (Kottelat, 1997; Freyhof et al., 2000).

Предложенное Бэческу и Майером (1969) название *elongatoides* определённо относится к щиповкам из бассейна Дуная. В подписи к контурному рисунку 3 указано, что обозначение “А” относится к изображению самца *C. taenia elongatoides* Vas. в англоязычной версии статьи (Băcescu, Maier, 1969) или *C. taenia elangotoides* Băc. – в русскоязычной (Бэческу, Майер, 1969. С. 54). При этом указывается конкретный локалитет – “река Аргесель” (Argesel) – приток р. Арджеш в Южных Карпатах. Однако двумя абзацами ранее для щиповок бассейна Дуная приводится ещё одно название – *taenioides*. С одной стороны, можно полагать, что Бэческу и Майер относят это название к тем же самым щиповкам, поскольку ниже, описывая характер взаимного расположения спинного и брюшных плавников у *C. taenioides* Băcescu et Maier, 1969, ссылаются на тот же рисунок 3А (Бэческу, Майер, 1969; Băcescu, Maier, 1969), однако они расширяют его распространение до “остальной Европы”. С другой стороны, это название можно считать и синонимом *C. taenia*, как это полагает Коттла (Kottelat, 1997), поскольку, характеризуя особен-

ности строения органа Канестрины *C. taenioides*, цитируемые авторы ссылаются на рисунок 5В, где, судя по подписи к нему, представлен орган самца *C. taenia taenia* из Англии (Бэческу, Майер, 1969; Băcescu, Maier, 1969). Поэтому название “*C. taenioides*” определённо следует считать *nomen dubium*.

Помимо упомянутых названий на основе 38 экз. щиповок (включая голотип) из дельты Дуная (Сагаогман, канал из пруда) и двух особей из долины Джурбан (Gurban) у д. Комана в 27 км к югу от г. Бухарест был описан вид *C. megaspila* Nalbant, 1993, валидность которого не раз подвергалась сомнению в той или иной форме (Васильева, Васильев, 1998; Ráb et al., 2000; Kottelat, Freyhof, 2007). Однако в свете современных данных представляется необходимым пересмотреть прежние заключения по номенклатуре дунайских щиповок.

Исходя из публикации Бэческу и Майера (1969. С. 57), диагностическими признаками *C. taenia elongatoides*, чей статус в последующих работах был поднят до видового, можно считать лишь форму органа Канестрины (в форме топора, как у генетической “*taenia*” серии) и характер расположения спинного и брюшных плавников: спинной плавник начинается значительно впереди оснований брюшных плавников, тогда как у других видов – на их уровне. Последующее описание *C. taenia danubialis* (это описание основано на другом материале – типовая серия включает рыб из верховьев р. Муреш (уезд Харгита), р. Тимиш в Банате, р. Сучава в Молдове) сопровождается уже более обширным диагнозом. Однако число признаков, позволяющих отличить данный таксон от описанного в той же работе *C. megaspila*, невелико. Помимо положения спинного и брюшных плавников (у *C. megaspila* они расположены на одном уровне), для *C. taenia danubialis* указывается редукция размеров и числа пятен четвёртой зоны Гамбетты (пятна вдоль средней линии бока). Эта форма щиповки считается обычной для бассейна Дуная в отличие от *C. megaspila*, характеризующегося узким ареалом (Nalbant, 1993).

В сводке по пресноводным рыбам Европы (Kottelat, Freyhof, 2007) для вида *C. elongatoides*, ареал которого распространён на весь бассейн Дуная, а также верховья Эльбы и Одра, приведён следующий диагноз: одно чёрное пятно в верхней части основания хвостового плавника размером с глаз или со зрачок, овальное или круглое; третья зона Гамбетты обычно шире второй; обе зоны заходят за основание спинного плавника; один орган Канестрины. Указывается, что по внешним характеристикам этот вид не отличим от симпатрично встречающихся гибридогенных особей, аналогично только по кариотипу он отличается от *C. vardarensis* Karaman, 1928 и *C. pontica* Vasil’eva et Vasil’ev, 2006. На фотографии, представляющей *C. elongatoides* из р. Нера (бассейн Дуная, Румы-

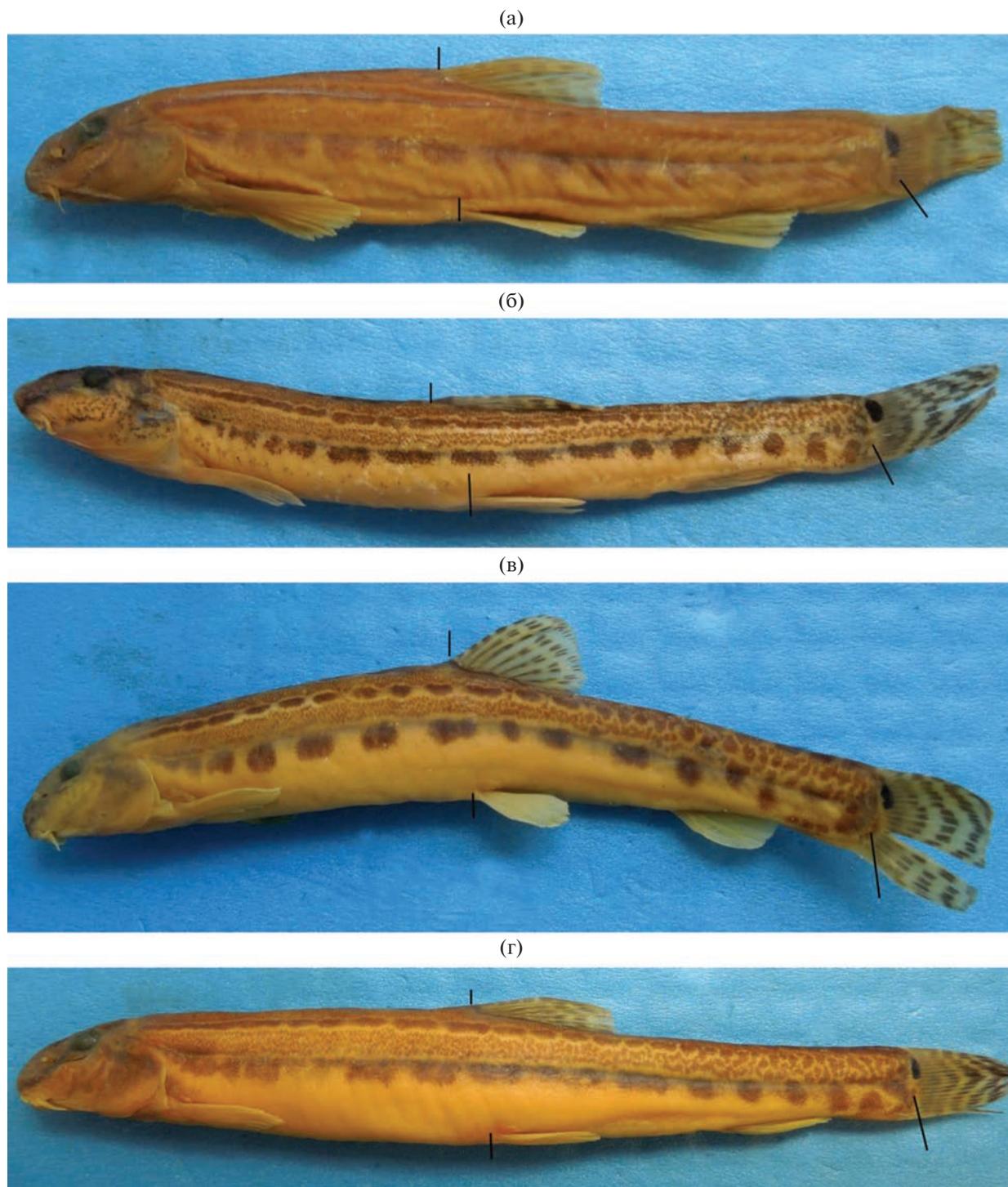


Рис. 3. Внешний вид *Cobitis elongatoides* из коллекции ЗММУ (здесь и на рис. 4 отмечены начала спинного и брюшных плавников и второе пятно у основания хвостового плавника): а – самец из р. Одер, P-21221, SL 65.0 мм, б – самка из р. Прут, P-23068, SL 75.0 мм, в – самка из русла р. Раковец, P-23071, SL 90.5 мм, г – самка из р. Драгиште, P-23073, SL 101.5 мм.

ния), ширина третьей зоны Гамбетты превышает высоту пятен четвертой зоны – самых крупных пятен в окраске щиповок. Диагноз, приведённый в цитируемой работе для *C. tanaitica*, соответству-

ет характеристикам популяций северной части Чёрного моря (третья зона Гамбетты заканчивается обычно под основанием спинного плавника, эта зона обычно уже второй зоны, одно чёрное

пятно у основания хвостового плавника), и на рисунке представлен экземпляр из бассейна Кубани, однако ареал вида продолжен вплоть до Дуная; вид *C. megaspila* авторы не упоминают. Приведённая информация даёт основания для следующих предположений. Во-первых, при составлении ключей и диагнозов авторы не имели из водоёмов Румынии диплоидных щиповок, относимых к "*C. tanaitica*" (какие-либо описания особенностей морфологии и окраски таких особей в литературе отсутствуют). Во-вторых, диагноз вида *C. elongatoides* был составлен на основе смешанного материала (диплоидных и полиплоидных форм разного происхождения) из бассейна Дуная. В пользу этого предположения свидетельствует не только диагноз, который не позволяет дифференцировать *C. elongatoides* от других дунайских щиповок, но также приведённый для самок максимальный размер — стандартная длина (*SL*) 130 мм, поскольку такой длины тела достигают только полиплоидные особи.

В этой связи особый интерес представляют сравнительные морфологические исследования щиповок с определённой плоидностью из кариотипированных популяций Польши (Kotusz, 2000). Эти исследования позволили выявить особенности окраски *C. elongatoides*, ранее не отмеченные в литературе. У диплоидных щиповок из двух популяций бассейна р. Одер, где диплоидный вид с маркерным кариотипом $2n = 28m + 18sm + 4sta$ и $NF = 96$, диагностируемый как *C. elongatoides* (таблица), обитает вместе с полиплоидными формами разного происхождения (Wojciak, Kotusz, 1999), имелось два пятна у основания хвостового плавника. Второе пятно, расположенное в нижней части основания плавника, было коричневого цвета, менее чёткое и существенно более узкое, чем блестящее чёрное пятно в верхней части. Это пятно могло быть сильно редуцированным и почти невидным — оно отсутствовало у 4 экз. из 30 изученных самок и 19 самцов, что составляло всего 8.2%. У всех совместно обитающих полиплоидных форм (изучено 98 экз.), а также у изученных особей *C. taenia* из популяций бассейнов рек Неман и Висла и симпатричных полиплоидов (104 экз.) пятно в нижней части основания хвостового плавника отсутствовало (Kotusz, 2000). Имелось второе пятно у обоих экземпляров *C. elongatoides* из бассейна Одера, переданных в коллекцию ЗММУ Я. Котушем (P-21221; рис. 3а).

Мы изучили выборку щиповок из руч. Пшовка в Чехии, где, по данным кариологического анализа (Ráb, Slavík, 1996), также совместно обитают *C. elongatoides*, триплоидная и тетраплоидная формы. Эта выборка (P-18159) состояла из шести самцов и 11 самок. Второе пятно в нижней части основания хвостового плавника (тонкое, в виде коричневатой скобки) имелось у трёх самцов (50.0%) и трёх самок (27.3%). Принимая во внимание, что

доля диплоидных самок в разных выборках из руч. Пшовка составляла от 25.0 до 66.7% всех самок (рассчитано по данным: Ráb, Slavík, 1996), а фиксированные материалы хранились ~20 лет и могли частично депигментироваться, наличие двух пятен у основания хвостового плавника определён характерно для большинства особей диплоидных щиповок руч. Пшовка. Хорошо заметно второе пятно на фотографиях двух особей *C. elongatoides* из других водоёмов Чехии (Hanel, Lusk, 2005). Сохранилось нижнее пятно и у самки щиповки из р. Малая Тиса (P-16311), хотя она в значительной степени обесцветилась за время хранения. Поскольку второе пятно у основания хвостового плавника присутствует у особей из разных частей ареала *C. elongatoides*, можно полагать, что его наличие (если не у всех, то у большинства рыб в популяции) является видовой особенностью данной щиповки.

У изученных нами ранее на большом коллекционном материале *C. taenia*, *C. tanaitica* и полиплоидных форм щиповок из разных водоёмов европейской части бывшего СНГ (Васильева, 1984; Васильева и др., 1989; Васильев и др., 1990; Осин и др., 1990; Васильева, Васильев, 1998) такое пятно не обнаружено. Не было такого пятна и у типовых экземпляров также очень сходных по внешней морфологии с *C. taenia* видов — *C. taurica* Vasil'eva, Vasil'ev, Janko, Ráb et Rábová, 2005 и *C. pontica* (Janko et al., 2005b; Vasil'eva, Vasil'ev, 2006). При этом следует подчеркнуть, что последний вид распространён в водах Болгарии и, по данным Коттлы и Фрейхова (Kottelat, Freyhof, 2007), в Турции, но щиповки из р. Южный Буг не относятся к этому виду, как ошибочно предполагают Янко с соавторами (Janko et al., 2007). В изученной выборке *C. vardarensis* из р. Вардар (P-20725) у самца имелось нижнее пятно сходного вида, а у всех четырёх самок в нижней части основания плавника просвечивало слабое затемнение, по форме сходное с пятном в верхней части.

Сравнение особей с двумя или одним пятном у основания хвостового плавника по основному диагностическому признаку *C. elongatoides*, предложенному Бэческу и Майером (1969) — характеру взаимного расположения спинного и брюшных плавников, дало следующие результаты. У всех изученных самцов из разных популяций (P-18159, P-21221, 7 экз.), независимо от числа пятен у основания хвостового плавника, основания брюшных плавников расположены заметно позади начала спинного плавника — на уровне его первого или второго (57.1%) ветвистого луча. У самок с двумя пятнами у основания хвостового плавника (5 экз.) основания брюшных плавников чаще располагались позади начала спинного плавника — на уровне его первого неветвистого (20%), первого (40%) или второго (20%) ветвистого луча; только у самки из р. Малая Тиса (P-16311) основания брюшных плавников располагались чуть впер-

ди начала спинного плавника. У самок с одним верхним пятном у основания хвостового плавника (9 экз.) основания брюшных плавников располагались чуть впереди спинного плавника (11.1%), на одном с ним уровне (11.1%), на уровне первого (44.4%) или второго (11.1%) неветвистого луча либо на уровне первого ветвистого (22.2%). Оба признака (положение плавников и число пятен) обнаруживали достоверную корреляцию с высокой степенью вероятности: коэффициент корреляции рангов $r = 0.845$ ($n = 20$, $p < 0.001$), т.е. у особей с двумя пятнами у основания хвостового плавника основания брюшных плавников обычно располагаются заметно позади начала спинного плавника в отличие от особей с одним верхним пятном.

Для сравнения можно также указать, что, например, в разных выборках *C. tanaitica* из бассейна Дона особи, у которых основания брюшных плавников расположены на уровне начала спинного плавника или даже впереди него, составляют от 38.1 (Васильева, Васильев, 1989) до 80.4% (настоящая работа); в репрезентативной выборке *C. taenia* и полиплоидных особей из бассейна Волги (P-17065) их 50.0%; преобладают такие рыбы и среди типовых экземпляров *C. taurica* и *C. pontica* (Janko et al., 2005b; Vasil'eva, Vasil'ev, 2006). Тогда как у самцов и самок щиповки с двумя пятнами из Тисы, Одера и Пшовки их всего 8.3%. Заметно позади начала спинного плавника (примерно на уровне его второго ветвистого луча) расположены основания брюшных плавников и на фотографиях самцов из водоёмов Чехии (Hanel, Lusk, 2005), у самца из р. Нера (Kottelat, Freyhof, 2007), а также у самца из р. Шпрее (Spree), бассейн Эльбы, Германия с заметным затемнением в нижней части основания хвостового плавника и кариотипом, включающим 46m-sm, 2st, 2a (Bohlen et al., 2005). У изученных особей *C. vardarensis* основания брюшных плавников расположены на уровне начала спинного плавника (80%) или на уровне его первого неветвистого луча.

Таким образом, диагностическими признаками щиповок с $2n = 50$, крайне низким числом одноплечих хромосом (2–4 st-a) и $NF = 96–98$ (таблица) следует считать наличие у большинства особей в популяции двух пятен у основания хвостового плавника и обычно сдвинутый вперёд по отношению к основаниям брюшных плавников спинной плавник. Тем самым они соответствуют диагнозу вида, описанного под названиями “*elongatoides*” и “*danubialis*” (Бэческу, Майер, 1969; Nalbant, 1993). На основе перечисленных выше диагностических характеристик вид *C. elongatoides* можно с большой степенью вероятности дифференцировать в полевых условиях от обитающих в тех же водоёмах полиплоидных форм гибридного происхождения. Соответственно, на основе полученных данных из упоминавшейся выборки (P-18159) из руч. Пшовка, где присутствие *C. elon-*

gatoides и полиплоидной гибридной формы было выявлено генетическими методами, мы выделили в отдельную пробу (P-22187) с диагнозом *C. elongatoides* 11 экземпляров: всех самцов, трёх самок с двумя пятнами у основания хвостового плавника и двух самок, у которых основания брюшных плавников располагались на уровне первого ветвистого луча спинного плавника. Среди также исследованных нами щиповок из бассейна р. Прут (система Дуная), первично фиксированных в растворе формальдегида, не изученных в генетическом отношении и представленных в пробах только самками (P-23067, P-23068, P-23071, P-23073), встречались экземпляры, у которых спинной плавник начинался заметно впереди основания брюшных плавников, а в нижней части основания хвостового плавника было заметно слабое коричневое пятно (рис. 3б–3г). Мы считаем, что эти пробы включают вид *C. elongatoides* и полиплоидных особей гибридного происхождения.

Что касается щиповок из оз. Синое (и других популяций с тем же кариотипом), то, как следует из настоящего исследования, единственное пригодное название, которое потенциально может быть им присвоено как валидное — “*C. megaspila*”. Диагноз этого вида, данный при описании (Nalbant, 1993), крайне мало информативен с точки зрения сравнения его с совокупностью других видов и форм, морфологически близких *C. taenia*, на что указывалось ранее (Васильева, Васильев, 1998). Однако в нём есть важная характеристика, противопоставляющая этот вид также обитающему в бассейне Дуная *C. elongatoides*: спинной плавник у этих щиповок расположен на одном уровне с основаниями брюшных плавников (Nalbant, 1993). Поскольку описание *C. megaspila* основано на значительном материале (см. выше), можно полагать, что упомянутые отличия носят, по меньшей мере, частотный характер, и морфологические признаки не дают оснований для предположения о конспецифичности *C. elongatoides* и *C. megaspila*. В свою очередь генетические данные определённо свидетельствуют о том, что в бассейне Дуная помимо *C. elongatoides* обитает ещё один вид, на данный момент идентифицируемый только по структуре кариотипа: $2n = 50 = 10m + 26sm + 14sta$, $NF = 86$.

Ряб с соавторами (Ráb et al., 2000. P. 64) сообщали, что, по их предварительным данным, кариотип, свойственный *C. elongatoides*, “был обнаружен в популяции щиповок из окрестностей Бухареста, Румыния (идентифицированной как *C. megaspila* Налбантом)”. В последующих публикациях для р. Комана (как отмечалось выше, 2 экз. щиповок из района д. Комана входили в число паратипов *C. megaspila*) указывается присутствие *C. elongatoides* и триплоидной формы с двумя гаплоидными наборами *C. elongatoides* и одним гаплоидным набором *C. tanaitica* (Bohlen, Ráb, 2001; Šlechtová et al., 2003; Janko et al., 2005a). Однако это не препятствует то-

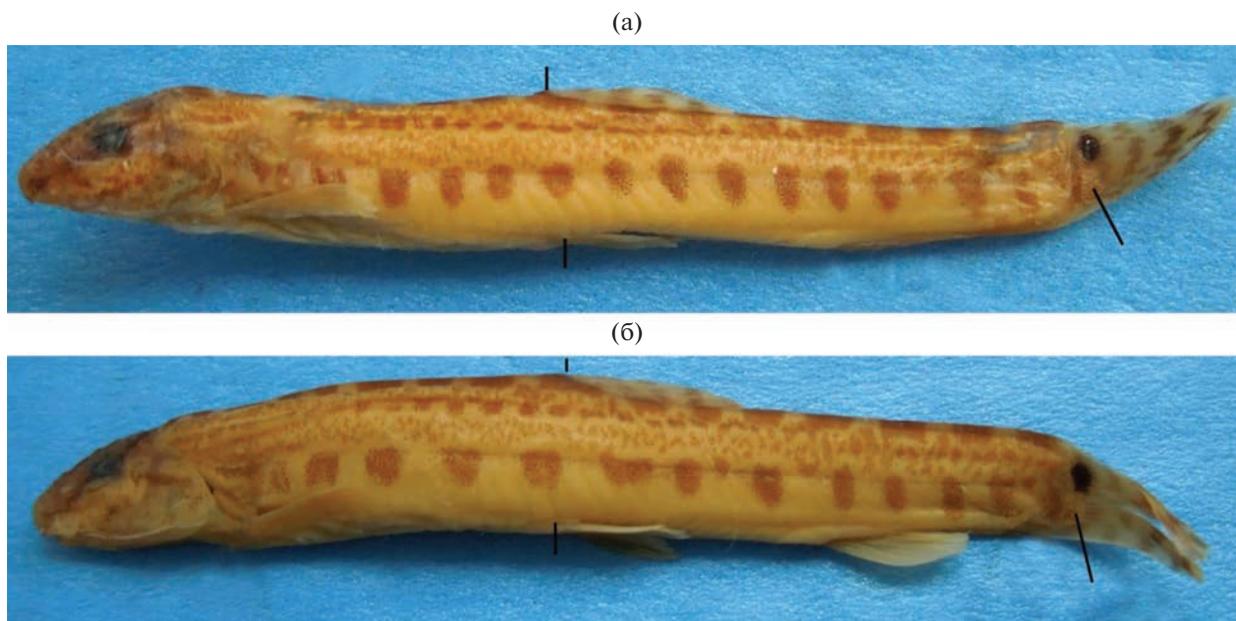


Рис. 4. Внешний вид щиповок из р. Раковец, P-23078, диагностированных как *Cobitis cf. megaspila*: а – SL 50.3 мм, б – SL 54.0 мм.

му, чтобы считать название *C. megaspila* пригодным и валидным для щиповок оз. Синое и других популяций с тем же кариотипом, даже если допустить, что паратипы *C. megaspila* из района Команы на самом деле относятся к виду *C. elongatoides* или являются полиплоидами. Хотя понятно, что генетические исследования проводили не на этих паратипах, которые, скорее всего, были фиксированы раствором формальдегида и мало пригодны для генетических исследований, и кариотипировано было всего 6 экз. из популяции. Аналогичная ситуация потенциально возможна и для части типовой серии из дельты Дуная – так, все 12 кариотипированных щиповок из канала в Караормане (типовой локалитет *C. megaspila*), по предварительным данным, оказались триплоидами с двумя гаплоидными наборами *C. elongatoides* и одним *C. tanaïtica* (Bohlen, Ráb, 2001). Однако типовая серия *C. megaspila* имеет значительное число самцов, включая голотип, которые, как и диплоидные самки, не были обнаружены в этом районе последующими исследователями.

Основанием для описания щиповок из оз. Синое (и других диплоидных популяций с тем же кариотипом) в качестве нового вида, отличного от *C. megaspila*, могло бы служить лишь доказательство того, что: 1) все особи типовой серии *C. megaspila* имеют другой кариотип (это невозможно, поскольку типовая серия не пригодна для таких исследований) или 2) морфологические особенности особей с кариотипом, обнаруженным у щиповок оз. Синое, находятся в явном противоречии с диагнозом *C. megaspila*, что представляется

маловероятным, поскольку этот диагноз в целом подходит для ряда видов, морфологически близких *C. taenia*. В частности, мы считаем необходимым отметить, что в изученной нами выборке щиповок из р. Раковец, притока р. Прут (P-23078), включающей только мелких особей ($SL \leq 54$ мм), у всех 5 экз. спинной плавник начинался на уровне основания брюшных плавников, пятна вдоль средней линии бока (четвёртая зона Гамбетты) были крупными, вытянутыми в вертикальном направлении, что соответствует диагнозу *C. megaspila*, однако у всех также имелось слабое пятно в нижней части основания хвостового плавника (рис. 4), свойственное *C. elongatoides*. Поскольку щиповки Дуная остаются до сих пор недостаточно изученными, мы определяем эту пробу как *Cobitis cf. megaspila*.

В заключение работы представляется необходимым отметить следующее. Использование молекулярных методов широко применяется в ихтиологических работах для уточнения таксономического статуса той или иной группы рыб. При этом не всегда молекулярные методы можно использовать в отрыве от других – морфологических или цитологических – подходов. В настоящей работе использование ISSR-маркеров позволило подтвердить самостоятельный статус щиповки из оз. Синое, который ранее предполагался на основе цитогенетических данных. Использование именно ISSR-анализа оправдано возможностью амплификации наиболее полиморфной части генома, что позволило выявить отличия, не обнаруженные другими молекулярными методами, такими

как секвенирование отдельных митохондриальных и ядерных генов. Результаты позволяют сделать следующие основные выводы.

1. Использование молекулярно-генетических маркеров полиморфизма ISSR-фрагментов ДНК позволяет успешно дифференцировать геномы разных видов щиповок, предположительно участвовавших в образовании полиплоидных форм гибридного происхождения. Несмотря на относительную сложность воспроизводства данных ДНК-фингерпринтинга, этот метод указывает на необходимость дальнейших исследований геномов диплоидных видов и полиплоидов с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS).

2. Щиповки оз. Синое и другие популяции Средней Европы с кариотипом $2n = 50$, $NF = 86$ дифференцируются по ISSR-маркерам от восточно-европейского вида *C. tanaitica*; на данном этапе исследований их следует рассматривать в ранге самостоятельного вида *C. megapila*.

3. Щиповки из Средней Европы с кариотипом $2n = 50$, $NF = 96$ соответствуют диагнозу вида *C. elongatoides*. Согласно проведённому морфологическому анализу, помимо структуры кариотипа *C. elongatoides* отличается от ряда близких видов и полиплоидных форм также следующим набором признаков: основания брюшных плавников, как правило, расположены заметно позади начала спинного плавника (на уровне его первых ветвистых лучей); в нижней половине основания хвостового плавника имеется дополнительное пятно меньших размеров и слабее выраженное, чем крупное интенсивно чёрное пятно в верхней части.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы глубоко благодарны коллегам, приславшим материал по изученным в настоящей работе щиповкам: П. Рябу, К. Янко (P. Ráb, K. Janko, IAPG CAS, Libechov), М. Повз (M. Povz, ZZRS, Ljubljana), Я. Котушу (J. Kotusz, UW, Wrocław), А.Я. Мошу (Институт зоологии АНМ, Кишинёв). Авторы выражают большую благодарность анонимным рецензентам за анализ работы и полезные замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Таксономические исследования рыб проведены Е.Д. Васильевой в рамках государственного задания МГУ № 121032300105-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Берг Л.С. 1949. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Ч. 2. М.; Л.: Изд-во АН СССР. С. 469–926.
Бэческу М., Майер Р. 1969. К познанию щиповок (*Cobitis*) Дона и Волги // Вопр. ихтиологии. Т. 9. Вып. 1 (54). С. 51–60.

Васильев В.П. 1995. Кариологическое разнообразие и таксономическая неоднородность *Cobitis "taenia"* (Pisces, Cobitidae) // Докл. АН. Т. 342. № 6. С. 839–842.

Васильев В.П., Васильева Е.Д. 1982. Новый диплоидно-полиплоидный комплекс у рыб // Докл. АН СССР. Т. 266. № 1. С. 250–252.

Васильев В.П., Васильева Е.Д., Осинов А.Г. 1990. К проблеме сетчатого видообразования у позвоночных: диплоидно-триплоидно-тетраплоидный комплекс в роде *Cobitis* (Cobitidae). IV. Тетраплоидные формы // Вопр. ихтиологии. Т. 30. Вып. 6. С. 908–919.

Васильев В.П., Лебедева Е.Б., Васильева Е.Д. и др. 2007. Пространственная и временная генетическая структура представителей бисексуальных и клональных видов позвоночных. Состав и генетическая структура клонально-бисексуальных комплексов рыб р. *Cobitis* (Cobitidae) // Матер. конф. "Динамика генофондов". М., С. 36–38.

Васильева Е.Д. 1984. Сравнительный морфологический анализ двух популяций щиповок (род *Cobitis*, Cobitidae), отличающихся числом пятен у основания хвостового плавника // Вопр. ихтиологии. Т. 24. Вып. 1. С. 43–53.

Васильева Е.Д., Васильев В.П. 1998. Виды-двойники в роде *Cobitis* (Cobitidae). 1. Южнорусская щиповка *Cobitis rossomeridionalis* sp. nova // Там же. Т. 38. № 5. С. 604–614.

Васильева Е.Д., Осинов А.Г., Васильев В.П. 1989. К проблеме сетчатого видообразования у позвоночных: диплоидно-триплоидно-тетраплоидный комплекс в роде *Cobitis* (Cobitidae). I. Диплоидные виды // Там же. Т. 29. Вып. 5. С. 705–717.

Гублер Е.В., Генкин А.А. 1973. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, 142 с.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. М.: Мир, 479 с.

Межжерин С.В., Чудакова Т.Ю. 2002. Генетическая структура диплоидно-полиплоидного комплекса щиповок *Cobitis taenia* (Cypriniformes: Cobitidae) бассейна Среднего Днепра // Генетика. Т. 38. № 1. С. 86–92.

Осинов А.Г., Васильева Е.Д., Васильев В.П. 1990. К проблеме сетчатого видообразования у позвоночных: диплоидно-триплоидно-тетраплоидный комплекс в роде *Cobitis* (Cobitidae). II. Характеристика триплоидной формы // Вопр. ихтиологии. Т. 30. Вып. 2. С. 214–220.

Băcescu M. 1962. Données nouvelles sur les lochs (*Cobitis*) d'Europe, avec references speciales sur les cagnettes de Italie du Nord // Travaux Mus. Natl. Hist. Nat. Grigore Antipa. V. 3. P. 282–301.

Băcescu M., Maier R. 1969. The *Cobitis* of the Don and Volga // J. Ichthyol. V. 9. P. 38–44.

Bohlen J., Ráb P. 2001. Species and hybrid richness in spined loaches of the genus *Cobitis* (Teleostei: Cobitidae), with a checklist of European forms and suggestions for conservation // J. Fish Biol. V. 59. Suppl. A. P. 75–89. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2001.1751>

Bohlen J., Ráb P., Šlechtová V. et al. 2002. Hybridogeneous biotypes in spined loaches (genus *Cobitis*) in Germany with implications for the conservation // Freshwater Fish Conservation: options for future. Oxford: Fishing News Books; Blackwell Sci. P. 311–321.

Bohlen J., Freyhof J., Wolter C. 2005. First records of *Cobitis elongatoides* and *Sabanejewia baltica* (Cobitidae) for Ger-

- many // *Cybium*. V. 29. № 1. P. 103–104.
<https://doi.org/10.26028/cybium/2005-291-014>
- Boroń A. 1995. Chromosome banding studies of spined loach *Cobitis taenia* (L.) // *Cytobios*. V. 81. P. 97–102.
- Boroń A., Danilkiewicz Z. 1998. Diploid-polyploid complex of spined loach *Cobitis taenia* sensu stricto and *Cobitis* sp. from the Bug River, Poland (Pisces, Cobitidae) // *Ibid*. V. 96. P. 13–22.
- Boroń A., Kotusz J. 1999. A preliminary report and karyotype of a new *Cobitis* species in the ichthyofauna of Poland // *Ibid*. V. 98. P. 59–64.
- Boroń A., Kotusz J. 2000. The preliminary data on diploid-polyploid complexes of the genus *Cobitis* in the Odra River basin, Poland (Pisces, Cobitidae) // *Folia Zool*. V. 49. Suppl. 1. P. 79–84.
- Boroń A., Culling M., Pułym A. 2003. Cytogenetic characteristics of the fish genus *Cobitis* from England // *Folia Biol. (Kraków)*. V. 51. Suppl. P. 13–16.
- Doadrio I., Perdices A. 2005. Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (*Cobitis*, Cobitidae) based on cytochrome b sequence data // *Mol. Phylogenet. Evol*. V. 37. № 2. P. 484–493.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.07.009>
- Freyhof J., Ráb P., Bohlen J. 2000. The valid names of some European species of the genus *Cobitis* (Teleostei, Cobitidae) // *Folia Zool*. V. 49. Suppl. 1. P. 3–7.
- Gupta M., Chyi Y.-S., Romero-Severson J. et al. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats // *Theor. Appl. Genet*. V. 89. № 7–8. P. 998–1006.
<https://doi.org/10.1007/BF00224530>
- Hanel L., Lusk S. 2005. Ryby a mihule České Republiky. Rozšíření a ochrana. Vlašim: ZO ČSOP Vlašim, 448 p.
- Janko K., Kotlík P., Ráb P. 2003. Evolutionary history of asexual hybrid loaches (*Cobitis*: Teleostei) inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation // *J. Evol. Biol*. V. 16. № 6. P. 1280–1287.
<https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00627.x>
- Janko K., Culling M.A., Ráb P. et al. 2005a. Ice age cloning – comparison of the Quaternary evolutionary histories of sexual and clonal forms of spiny loaches (*Cobitis*; Teleostei) using the analysis of mitochondrial DNA variation // *Mol. Ecol*. V. 14. № 10. P. 2991–3004.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02583.x>
- Janko K., Vasil'ev V.P., Ráb P. et al. 2005b. Genetic and morphological analyses of 50-chromosome spined loaches (*Cobitis*, Cobitidae, Pisces) from the Black Sea basin that are morphologically similar to *C. taenia*, with the description of a new species // *Folia Zool*. V. 54. № 4. P. 405–420.
- Janko K., Flajšhans M., Choleva L. et al. 2007. Diversity of European spined loaches (genus *Cobitis* L.): an update of the geographic distribution of the *Cobitis taenia* hybrid complex with a description of new molecular tools for species and hybrid determination // *J. Fish Biol*. V. 71. Suppl. C. P. 387–408.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01663.x>
- Janko K, Paček J, Wilkinson-Herbots H. et al. 2018. Hybrid asexuality as a primary postzygotic barrier between nascent species: on the interconnection between asexuality, hybridization // *Mol. Ecol*. V. 27. № 1. P. 248–263.
<https://doi.org/10.1111/mec.14377>
- Kottelat M. 1997. European freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR) with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation // *Biologia, Bratislava*. V. 52. Suppl. 5. P. 1–271.
- Kottelat M., Freyhof J. 2007. Handbook of european freshwater fishes. Cornol; Berlin: Kottelat et Freyhof, 646 p.
- Kotusz J. 2000. Intra- and interpopulation morphological variability in diploid and varied-ploidy *Cobitis* from Poland // *Folia Zool*. V. 49. Suppl. 1. P. 219–226.
- Lusk S., Koščo J., Halačka K. et al. 2003. Identification of *Cobitis* from the Slovakian part of the Tisza basin // *Folia Biol. (Kraków)*. V. 51. Suppl. P. 61–65.
- Majtánová Z., Choleva L., Symonová R. et al. 2016. Asexual reproduction does not apparently increase the rate of chromosomal evolution: karyotype stability in diploid and triploid clonal hybrid fish (*Cobitis*, Cypriniformes, Teleostei) // *PLoS One*. V. 11. № 1. Article e0146872.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146872>
- Nalbant T.T. 1993. Some problems in the systematic of the genus *Cobitis* and its relatives (Pisces, Ostariophysi, Cobitidae) // *Rev. Roum. Biol. Sér. Biol. Anim*. V. 38. № 2. P. 101–110.
- Ráb P., Slavík O. 1996. Diploid-triploid-tetraploid complex of the spined loach, genus *Cobitis* in Pšovka Creek: the first evidence of the new species of *Cobitis* in the ichthyofauna of the Czech Republic // *Acta Univ. Carol. Biol*. V. 39. P. 201–214.
- Ráb P., Rábová M., Bohlen J., Lusk S. 2000. Genetic differentiation of the two hybrid diploid-polyploid complexes of loaches, genus *Cobitis* (Cobitidae), in Czech Republic, involving *C. taenia*, *C. elongatoides* and *C. spp.* in the Czech Republic: Karyotypes and cytogenetic diversity // *Folia Zool*. V. 49. Suppl. 1. P. 55–66.
- Šlechtová V., Lusková V., Šlechtá V. et al. 2000. Genetic differentiation of two diploid-polyploid complexes of spined loach, genus *Cobitis* (Cobitidae), in Czech Republic, involving *C. taenia*, *C. elongatoides*, and *C. spp.*: Allozyme interpopulation and interspecific differences // *Ibid*. V. 49. Suppl. 1. P. 67–78.
- Šlechtová V., Lusková V., Šlechtá V. et al. 2003. Potential species identification by allozyme/protein markers in European spined loaches // *Folia Biol. (Kraków)*. V. 51. Suppl. P. 43–47.
- Szlachciak J., Boroń A. 2003. A numerical taxonomic study of several *Cobitis* species (Pisces, Cobitidae) based on their cytogenetic features // *Ibid*. V. 51. Suppl. P. 7–11.
- Vasil'ev V.P., Vasil'eva E.D., Osinov A.G. 1989. Evolution of a diploid-triploid-tetraploid complex in fishes of the genus *Cobitis* (Pisces, Cobitidae) // *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. Albany: N.Y. State Mus. P. 153–169.
- Vasil'ev V.P., Lebedeva E.B., Vasil'eva E.D. 2011. Evolutionary ecology of clonal-bisexual complexes in spined loaches from genus *Cobitis* (Pisces, Cobitidae) // *J. Ichthyol*. V. 51. № 10. P. 932–940.
<https://doi.org/10.1134/S0032945211100067>
- Vasil'eva E.D., Vasil'ev V.P. 2006. *Cobitis pontica* sp. nova—a new spined loach species (Cobitidae) from the Bulgarian waters // *Ibid*. V. 46. Suppl. 1. P. S15–S20.
<https://doi.org/10.1134/S003294520610002X>
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. V. 20. № 2. P. 176–183.
<https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>