

УДК 575.13:597.541

## ХАРАКТЕРИСТИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОЛНОГО МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА *Clupeonella cultriventris* (Actinopterygii: Clupeiformes) – ЧУЖЕРОДНОГО ВИДА РЫБ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА (Р. ВОЛГА)

© 2025 г. Д. П. Карабанов<sup>а,\*</sup>, Ю. В. Кодухова<sup>а</sup>, А. А. Котов<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., Россия

<sup>б</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: dk@ibiw.ru

Поступила в редакцию 28.01.2024 г.

После доработки 12.03.2024 г.

Принята к публикации 17.03.2024 г.

Черноморско-каспийская тюлька (килька, сарделька) *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) (Actinopterygii: Clupeiformes) – мелкий пелагический вид, самый массовый из чужеродных видов рыб Волжско-Камского бассейна, являющийся одним из ключевых элементов трофических сетей в пресноводных экосистемах. В работе приведена характеристика полного митохондриального генома черноморской-каспийской тюльки из однозначно адвентивной популяции Верхней Волги (58°23'19" с.ш., 38°19'37" в.д.). Определение ваучера было выполнено как по морфологическим признакам, так и по идентичности последовательностей ДНК в международной базе данных NCBI GenBank. Для секвенирования полного митохондриального генома было использовано классическое секвенирование по Сэнгеру с ПЦР-продукта от набора из 48 пар праймеров, дающих полное перекрытие и однозначное прочтение каждого нуклеотида не менее чем в двух повторностях. Проаннотированный полный митогеном *C. cultriventris* длиной 16650 пн с консервативным для сельдевых рыб расположением генов содержит 22 транспортных РНК, 13 белок-кодирующих генов, две рибосомальные РНК и одну некодирующую область. Полученный митохондриальный геном демонстрирует сходство в 98.7% с изученным ранее вариантом из Каспийского моря. Исходя из этих данных, нет достаточных оснований к выделению пресноводных тюлек Волжско-Камского региона в отдельный таксон.

**Ключевые слова:** Clupeiformes, черноморско-каспийская тюлька, *Clupeonella cultriventris*, чужеродные виды, митохондриальный геном, геномика

**DOI:** 10.31857/S0320965225010191, **EDN:** CDKUQK

### ВВЕДЕНИЕ

Черноморско-каспийская тюлька (килька, сарделька) *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) (Clupeiformes: Clupeidae/Ehiravidae), изначально солоновато-водный понто-каспийский вид рыб, в настоящее время успешно расселилась по всему Волго-Камскому бассейну (Karanov et al., 2023). Уже в начале XXI в. в водохранилищах Верхней Волги тюлька стала видом–сверхдоминантом в пелагическом сообществе, являясь ключевым компонентом трофических сетей в водоеме (Kiyashko et al., 2012). Вместе с тем идентификация видов рыб рода *Clupeonella* Kessler, 1877 часто затруднена из-за широкого географического ареала и морфологических особенностей популяций, обитающих в разных экологических условиях. После ряда ревизий внутри

вида *C. cultriventris* были сохранены только два подвида: азово-черноморский *C. c. cultriventris* и каспийский *C. c. caspia* (Whitehead, 1985). В дальнейшем выделение внутривидовых таксонов было поставлено под сомнение (Reshetnikov et al., 1997), но после принятия “филогенетической” (а по факту – чисто кладистической) концепции вида каспийскую, азово-черноморскую и пресноводную тюльку выделяли как независимые таксоны (Kottelat, Freyhof, 2007). Таким образом, в настоящее время считается, что Волжско-Камский бассейн заселен *Clupeonella tscharchalensis* (Borodin, 1896) – самостоятельным валидным видом (Froese, Pauly, 2023) пресноводных тюлек сем. Ehiravidae Deraniyagala, 1929 (Wang et al., 2022). Помимо теоретического значения, достоверность видовой идентификации в данном случае важна для организации рациональной эксплуатации

биоресурсов. Так, в структуре промышленного вылова на тюльку приходится 11.5% диадромных рыб, что составляет 0.4% всей рыбной продукции внутренних водоемов мира (FAO..., 2023).

Облегчить и повысить качество идентификации живых организмов позволяют современные методы, основанные на ДНК-таксономии (Rehndt et al., 2023). Однако отдельные гены слишком коротки, чтобы точно отражать реальные филогенетические отношения между видами и различать близкородственные виды. Напротив, митохондриальный геном, который содержит большую последовательность и дополнительные информативные участки, рассматривается как мощный молекулярный маркер для выявления филогенетических связей, изучения популяционной генетики и таксономической диагностики из-за его многокопийности, высокой консервативности, материнской наследственности и компактной организации генов (Curole, Kocher, 1999).

Цель данного исследования — определить последовательность нуклеотидов и аннотировать полный митохондриальный геном черноморско-каспийской тюльки из Рыбинского водохранилища (Верхняя Волга). На основании этих данных проанализирован таксономический статус пресноводной тюльки из р. Волги относительно референсных данных от образца из Каспийского моря. Генетическая информация о митогеноме *C. cultriventris* поможет расширить имеющиеся молекулярные данные по сельдевым рыбам для дальнейших таксономических и филогенетических работ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ваучер (№ d010) *C. cultriventris* для секвенирования митогенома был отловлен 23 июля 2014 г. в Центральном плесе Рыбинского водохранилища (р. Волга), координаты 58°23'19" с.ш., 38°19'37" в.д. По морфологическим признакам этот экземпляр полностью соответствует диагнозу черноморско-каспийской тюльки (Svetovidov, 1963) или пресноводной тюльки по “новой” системе (Kottelat, Freyhof, 2007): общая длина рыбы  $L = 100.3$  мм; длина тела рыбы до конца чешуйного покрова  $l = 86.8$  мм; брюхо сжато с боков; длина головы  $s = 20.7$  мм; высота головы  $hc = 16.3$  мм; диаметр глаза  $do = 5.7$  мм; длина верхней челюсти  $lmx = 8.2$  мм; антедорсальное расстояние  $aD = 41.9$  мм; антевентральное расстояние  $aV = 46$  мм; вентроанальное расстояние  $IA = 16.9$  мм; высота левого грудного плавника  $IP = 14$  мм; высота левого брюшного плавника  $IV = 8.6$  мм; высота анального плавника  $IA = 14.2$  мм; высота спинного плавника  $ID = 12.4$  мм; наибольшая высота тела  $H = 26.1$  мм; высота хвостового стебля  $h = 7.7$  мм; брюшные килевые чешуи хорошо выражены и на всем протяжении от горла до анального плавника образуют

киль; килевых чешуй  $s.sq.$  26; лучей в анальном плавнике  $A$  III 15 (два последних луча существенно длиннее предыдущих); лучей в спинном плавнике  $D$  IV 12; лучей в брюшных плавниках  $V$  I 7; жаберных тычинок  $sp.br.$  48, 47 слева и справа соответственно; общее число позвонков  $Vert.$  43, из них 27 в хвостовом и переходном отделах  $Vi + Vc$  по А.Н. Световидову (Svetovidov, 1963). Проведенный ранее ДНК-баркодирование по локусу COX1 (Karabanov et al., 2022) показал сходство данного ваучера с референсной последовательностью NCBI GenBank NC\_015109 (Lavoue et al., 2013) на уровне 99.1%, что позволяет однозначно отнести ваучер № d010 к тюлкам рода *Clupeonella*.

Общую геномную ДНК экстрагировали из мышечной ткани рыбы согласно ранее предложенному нами протоколу (Karabanov et al., 2022). Амплификацию фрагментов митогенома проводили на парах праймеров, смоделированных в программе MitoPrimer ver.1 (Yang et al., 2011). В качестве входящих геномов использовали референсные для Clupeidae последовательности из GenBank: NC\_009576 (*Alosa pseudoharengus* (Wilson, 1811), Северная Атлантика), NC\_014266 (*Brevoortia tyrannus* (Latrobe, 1802), Северная Атлантика), NC\_015109 (*Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840), Каспийское море), NC\_033407 (*Sardinella longiceps* Valenciennes, 1847, Аравийское море) с направляющим геномом KC193696 (*Clupea harengus* L., 1758, Балтийское море). Набор праймеров, их комбинация и температуры гибридизации даны в Доп. мат. табл. S1. Использование данного набора обеспечило однозначное секвенирование каждого нуклеотида не менее чем в двух прочтениях. Проведение ПЦР, очистка продукта и секвенирование проведено по ранее описанной нами методике (Karabanov et al., 2022). Секвенирование с прямого и обратного праймеров выполнено на автоматическом ДНК-секвенаторе “Нанофор-05” (НПК “Синтол”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Контроль качества прочтений, удаление праймеров, сборка и верификация полногеномной последовательности анализировали в программе UGENE ver. 49.1 (Okonechnikov et al., 2012). Аннотирование митогенома проводили на веб-сервере MitoFish (Zhu et al., 2023). Визуализацию кругового митогенома, расчет GC-состава и асимметрии митохондриальной цепи ДНК выполняли на веб-сервере Proksee (Grant et al., 2023). Для предсказания вторичной структуры РНК использовали алгоритм mfold2 (Sato et al., 2021). Все остальные генетические расчеты выполняли в программе MEGA ver. 11.0 (Tamura et al., 2021). Полный митохондриальный геном после проверки данных представлен в NCBI GenBank, номер записи PP050458.<sup>1</sup>

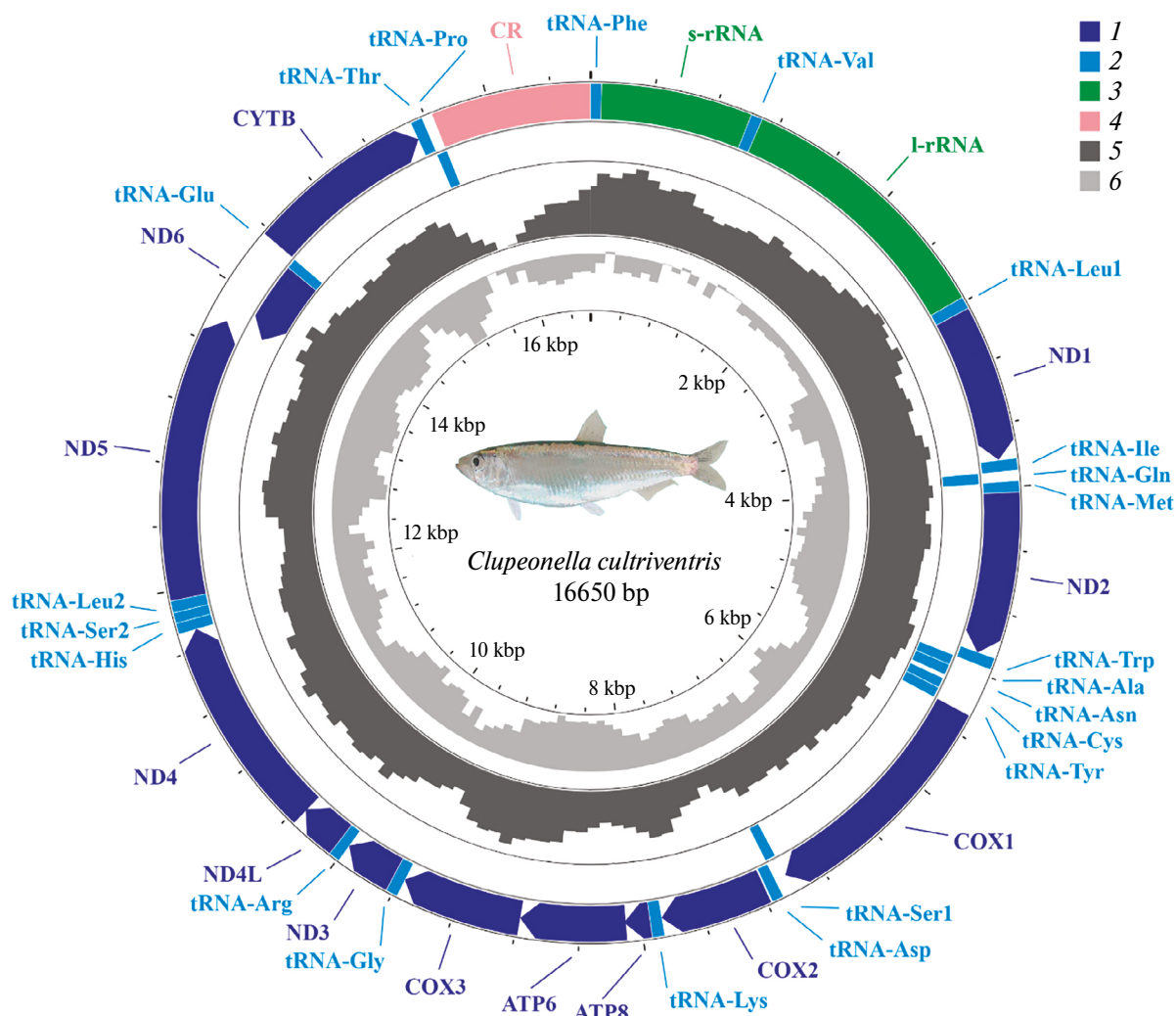
<sup>1</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/PP050458.1>

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученный круговой митохондриальный геном *C. cultriventris* имеет длину 16 650 пн и состоит из 12 белок-кодирующих генов (PCG), 22 транспортных РНК (tRNA), 2 рибосомальных РНК (rRNA) и одной некодирующей области контрольного региона (рис. 1, табл. 1). В целом можно отметить, что длина, структура и организация митогенома черноморско-каспийской тюльки соответствует таковой для сельдевых рыб (Lavoie et al., 2007). Среди всех 37 генов митогенома только на “легкой” цепи L локализовано восемь генов тРНК и ген ND6, все остальные гены кодируются “тяжелой” цепью H. По нуклеотидному составу в митогеноме несколько преобладают пиримидиновые останки (A% = 26.2, G% = 19.3, C% = 27.9, T% = 26.7) и наблюдается отрицательный

GC-перекос (−0.182). Для белок-кодирующих генов соотношение нуклеотидов несколько иное: A% = 23.8, G% = 19.3, C% = 27.9, T% = 29.0 при отрицательном GC-перекосе (−0.233).

Общая длина PCG составляет 11 424 пн, что составляет 68.6% всего митогенома. Всего 13 генов, кодирующих белок, содержат 3806 кодонов. Частоты встречаемости конкретных кодонов в PCG митогенома тюльки из Рыбинского водохранилища и Каспийского моря представлены в Доп. мат. табл. S2. Среди наиболее распространенных кодонов можно отметить (по трансляции мРНК) CCU, CCC и CCA (Pro), UCU (Ser) и CUU (Leu1), из стоп-кодонов самый распространенный – UAA, стандартный старт-кодон – ATG (табл. 1, Доп. мат. табл. S2).



**Рис. 1.** Круговая карта митохондриального генома *Clupeonella cultriventris* (р. Волга, Рыбинское водохранилище). Внешний круг указывает на расположение и распределение генов в митогеноме. Гены, кодируемые H (+) цепью и L (−) цепью ДНК отображены во внешнем и внутреннем кольцах соответственно. Условные обозначения: 1 – белок-кодирующие гены; 2 – транспортная РНК; 3 – рибосомальная РНК; 4 – контрольный регион; 5 – содержание нуклеотидов G и C в молекуле ДНК (GC-content; размах значений 0.341–0.543); 6 – неравномерность распределения нуклеотидов G + C в молекуле ДНК (GC-skew; размах значений (−0.34 – 0.02)).

**Таблица 1.** Организация полноразмерного митохондриального генома *Clupeonella cultriventris* (р. Волга, Рыбинское водохранилище)

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

Примечание. Цепь ДНК соответствует (+) для цепи Н и (–) для цепи L. Размер гена определен в парах нуклеотидов (пн) и для белок-кодирующих генов в аминокислотных остатках (аа). Межгенный промежуток соответствует вставке (при положительном значении) или перекрыванию генов (отрицательное значение). Антикодон цепи ДНК приведен для генов тРНК, для белок-кодирующих генов приведены старт- и стоп-кодоны (неполный стоп-кодон TAA завершается добавлением аденинов на 3'-конец мРНК).

В анализируемом митохондриальном геноме *C. cultriventris* обнаружены все 22 гена тРНК, типичные для рыб, из них 14 генов кодированы на Н-цепи и 8 генов – на L-цепи ДНК (рис. 1, табл. 1). Длина этих генов варьируется от 66 пн (tRNA-Cys) до 75 пн (tRNA-Leu1), общая длина всех транспортных РНК равна 1 553 пн. Вторичная структура всех 22 тРНК представлена в Доп. мат. табл. S3. Все тРНК образуют типичные вторичные структуры “клеверного листа”, за исключением tRNA-Ser2 (GCT), у которых, как и у многих других рыб, редуцировано плечо DHU (Satoh et al., 2016).

Ген малой (12S) субъединицы рРНК имеет длину 952 пн, расположен между транспортными РНК tRNA-Phe и tRNA-Val. Ген большой (16S) рибосомальной субъединицы длиной 1680 пн расположен между tRNA-Val и tRNA-Leu1. Вторичная структура обеих субъединиц митохондриальной РНК представлена в Доп. мат. табл. S4. Как и у других рыб, рРНК тюльки имеет сложную дуплексно-петельную организацию с чередованием консервативных и варибельных участков (Satoh et al., 2016).

Контрольный регион (CR, D-loop) у тюльки довольно компактный (1003 пн), локализован между tRNA-Pro и tRNA-Phe. Нуклеотидный состав контрольного региона специфичен. Непрерывная последовательность поли-Т (участок 641–649 гена CR), охватывающая девять нуклеотидов (предположительно, служит препятствием для секвеназы) локализуется перед АТ-богатой областью CSB-I (участок 686–701 гена CR). Также в контрольном регионе тюльки можно выделить локусы CSB-D (Т-богатый регион, участок 549–566 гена CR) и CSB-II (С-богатый регион, участок 872–884 гена CR). Вероятно, такая сложная организация контрольного региона играет роль в репликации и транскрипции генома (Satoh et al., 2016).

Таким образом, организация митохондриального генома пресноводной тюльки из Рыбинского водохранилища качественно не отличается от таковой для образца из Каспийского моря. По общему счету различия между геномами – 215 нуклеотидов (1.29%), при этом варибельность по 23 позициям приходится на некодирующую последовательность контрольного региона.

Считается, что для рыб межвидовые различия в генетических дистанциях в среднем составляют ~3% (Phillips et al., 2022), хотя могут и сильно варьировать у разных групп. В любом случае для достоверной делимитации желательно ориентироваться на “правило 10х” (Hebert et al., 2004), по которому внутривидовая генетическая изменчивость должна быть на порядок меньше межвидовой. Если проанализировать варибельность только среди пресноводных популяций тюльки и только для Верхней Волги (Karabanov et al., 2022),

то внутривидовая изменчивость по гену COX1 составит 0.29%. При анализе всех пресноводных популяций рек Волги (без учета незарегулированного участка) и Камы изменчивость составляет 1.34%, что соответствует уровню дифференциации между “морскими” и “пресноводными” тюльками в целом. Фактически идентичность последовательностей мтДНК двух предполагаемых видов *C. cultriventris* и *C. tscharchalensis* слишком высока, чтобы их можно было отличить друг от друга не только по последовательности области COX1, применяемой для ДНК-баркодинга, но и при рассмотрении митогенома целиком.

Ранее были предложены морфологические ключи для различения этих двух видов (Kottelat, Freyhof, 2007), однако диагностические признаки разных тюлек в них перекрываются, и единственным “признаком” для различения видов служит регион обитания животного. Более того, среди тюлек из разных бассейнов представлены аналогичные гаплотипы COX1 (Karabanov et al., 2022), что тоже не подтверждает существование географически обособленных независимых филогенетических линий. Имеющиеся различия в частотах аллозимов между морскими и пресноводными популяциями тюльки (Karabanov, Kodukhova, 2018), вероятнее всего, имеют адаптационное значение и не могут служить целям делимитации видов. Наблюдающиеся некоторые морфологические различия между популяциями тюлек из разных водоемов также объясняются локальными условиями обитания (Kasyanov, 2009) и не позволяют определить межвидовой хиатус.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом исследовании представлена проаннотированная полная последовательность митохондриальной ДНК черноморско-каспийской тюльки из Рыбинского водохранилища (р. Волга). Митогеном имеет длину 16 650 пн с консервативным расположением генов и включает типичный для рыб набор из 2 генов рибосомальной РНК, 22 генов транспортной РНК, 13 генов, кодирующих белок, и одной некодирующей области контрольного региона. Структура митохондриального генома *C. cultriventris* из пресного Рыбинского водохранилища была гомологична таковой у экземпляра из Каспийского моря. Анализ нуклеотидной изменчивости полного митохондриального генома пресноводных и морских тюлек не дает оснований к разделению вида *C. cultriventris* на несколько независимых таксонов.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0320965225010191.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность администрации Института биологии внутренних вод РАН, Центру коллективного пользования “Научный флот Института биологии внутренних вод РАН”, команде и научному составу научно-экспедиционного судна “Академик Топчиев” за возможность проведения многолетнего мониторинга биологических инвазий в Волжско-Камском бассейне.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Curole J.P., Kocher T.D. 1999. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes // Trends in ecology and evolution. V. 14. № 10. P. 394. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01660-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01660-2)
- FAO yearbook. 2023. Fishery and Aquaculture Statistics 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <https://doi.org/10.4060/cc7493en>
- Froese R., Pauly D., 2023. FishBase. World Wide Web electronic publication: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version 10/2023. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) (accessed 10 January 2024).
- Grant J.R., Enns E., Marinier E. et al. 2023. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes // Nucleic Acids Res. V. 51. № W1. P. W484. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes // PLoS Biol. V. 2. № 10. P. e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Karabanov D.P., Bekker E.I., Pavlov D.D. et al. 2022. New sets of primers for DNA identification of non-indigenous fish species in the Volga-Kama basin (European Russia) // Water. V. 14. № 3. P. e437. <https://doi.org/10.3390/w14030437>
- Karabanov D.P., Kodukhova Y.V. 2018. Biochemical polymorphism and intraspecific structure in populations of Kilka *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) from natural and invasive parts of its range // Inland Water Biol. V. 11. № 4. P. 496. <https://doi.org/10.1134/S1995082918040107>
- Karabanov D.P., Pavlov D.D., Dgebuadze Y.Y. et al. 2023. A dataset of non-indigenous and native fish of the Volga and Kama Rivers (European Russia) // Data. V. 8. № 10. P. 154. <https://doi.org/10.3390/data8100154>
- Kasyanov A.N. 2009. Study of some meristic features in the Black Sea Caspian kilka (*Clupeonella cultriventris*, Clupeidae) introduced in Volga River reservoirs // J. Ichthyol. V. 49. № 8. P. 642. <https://doi.org/10.1134/S0032945209080086>
- Kiyashko V.I., Karabanov D.P., Yakovlev V.N., Slyn'ko Y.V. 2012. Formation and development of the Black Sea-Caspian kilka *Clupeonella cultriventris* (Clupeidae) in the Rybinsk reservoir // J. Ichthyol. V. 52. № 8. P. 537. <https://doi.org/10.1134/S0032945212040042>
- Kottelat M., Freyhof J. 2007. Handbook of European freshwater fishes. Cornol: Publications Kottelat.
- Lavoue S., Miya M., Musikasinthorn P. et al. 2013. Mitogenomic evidence for an Indo-West Pacific origin of the Clupeoidei (Teleostei: Clupeiformes) // PLoS ONE. V. 8. № 2. P. e56485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056485>
- Lavoue S., Miya M., Saitoh K. et al. 2007. Phylogenetic relationships among anchovies, sardines, herrings and their relatives (Clupeiformes), inferred from whole mitogenome sequences // Molecular phylogenetics and evolution. V. 43. № 3. P. 1096. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.09.018>
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. V. 28. № 8. P. 1166. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Phillips J.D., Gillis D.J., Hanner R.H. 2022. Lack of statistical rigor in DNA barcoding likely invalidates the presence of a true species' barcode gap // Frontiers in ecology and evolution. V. 10. P. 859099. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.859099>
- Reshetnikov Y.S., Bogutskaya N.G., Vasil'eva E.D. et al. 1997. An annotated check-list of the freshwater fishes of Russia // J. Ichthyol. V. 37. № 9. P. 687.
- Rheindt F.E., Bouchard P., Pyle R.L. et al. 2023. Tightening the requirements for species diagnoses would help integrate DNA-based descriptions in taxonomic practice // PLoS Biol. V. 21. № 8. P. e3002251. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002251>
- Sato K., Akiyama M., Sakakibara Y. 2021. RNA secondary structure prediction using deep learning with thermodynamic integration // Nature Commun. V. 12. № 1. P. 941. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21194-4>
- Satoh T.P., Miya M., Mabuchi K., Nishida M. 2016. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes // BMC Genomics. V. 17. № 1. P. 719. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3054-y>
- Svetovidov A.N. 1963. Clupeidae: Fauna of U.S.S.R. — Fishes. V. II. Number 1. Jerusalem, Israel: Israel Program for Scientific Translations.
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 // Mol. Biol. and Evol. V. 38. № 7. P. 3022. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Wang Q., Purrafee Dizaj L., Huang J. et al. 2022. Molecular phylogenetics of the Clupeiformes based on exon-capture data and a new classification of the order // Molecular Phyl. and Evol. V. 175. P. 107590. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107590>
- Whitehead P.J.P. 1985. FAO species catalogue. Volume 7 — Clupeoid fishes of the World (suborder Clupeoidei). Part 1 — Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Yang C.-H., Chang H.-W., Ho C.-H. et al. 2011. Conserved PCR primer set designing for closely-related species

to complete mitochondrial genome sequencing using a sliding window-based PSO algorithm // PLoS ONE. V. 6. № 3. P. e17729.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017729>

Zhu T., Sato Y., Sado T. et al. 2023. MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish Pipeline: updates in 10 years // Mol. Biol. and Evol. V. 40. № 3. P. 035.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msad035>

## Characterization and Phylogenetic Significance of the Complete Mitochondrial Genome of *Clupeonella cultriventris* (Actinopterygii: Clupeiformes), a Nonindigenous Fish Species of the Rybinsk Reservoir (Volga River)

D. P. Karabanov<sup>1, \*</sup>, Y. V. Kodukhova<sup>1</sup>, A. A. Kotov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, Nekouzsky raion, Yaroslavl oblast, Russia

<sup>2</sup>A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

\*e-mail: [dk@ibiw.ru](mailto:dk@ibiw.ru)

The Black and Caspian Sea Sprat, or Tyulka (Kilka or Sardelka) *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) (Actinopterygii: Clupeiformes) is a small pelagic species, the most abundant nonindigenous fish species of the Volga-Kama basin playing an important role as one of the key elements of food webs in freshwater ecosystems. In this paper, we characterize the complete mitochondrial genome of Tulka from an unambiguously adventive population of the Upper Volga (58.38861 N, 38.32694 E). Voucher identification was performed both by morphological characters and a DNA sequence blast against the GenBank international database. For sequencing of the complete mitochondrial genome, a classical Sanger sequencing was applied with the PCR product from a set of 48 primer pairs giving a complete overlapping and unambiguous reading of each nucleotide in at least two replications. Annotated full mitogenome of *C. cultriventris* with length of 16650 bp has a gene arrangement characteristic of (and conservative) Clupeiformes contains 22 transport RNAs, 13 protein-coding genes, two ribosomal RNAs, and a single noncoding region. This mitochondrial genome demonstrates a 98.7% similarity to the previously studied one from the Black Sea. Based on these data, there are no sufficient reasons to separate the freshwater Sprat of the Volga-Kama region into a separate taxon.

**Keywords:** Clupeiformes, Black and Caspian Sea Sprat, *Clupeonella cultriventris*, nonindigenous species, complete mitochondrial genome, genomics