

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЧЕРНОМОРСКО-АЗОВСКОЙ СЕЛЬДИ *ALOSA PONTICA* (EICHWALD, 1838) (CLUPEIFORMES, ALOSINAE) ДУНАЯ: АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ ГЕННЫХ МАРКЕРОВ



Посредством биохимического генного маркирования исследована генетическая изменчивость и проведен первичный анализ структурированности дунайского стада черноморской сельди *Alosa pontica* в течение нерестового хода. Из 26 проанализированных локусов, имеющих экспрессию в мышцах, крови и ретине глаза, существенный полиморфизм обнаружен только в 3 (*mAat*, *Es-D* и *Es-3*). Уровни гетерозиготности в популяции составили  $H_{obs} = 0,029$  и  $H_{exp} = 0,034$  соответственно при доле полиморфных локусов  $P_{0,05} = 11,5\%$ , что значительно ниже среднего для популяций костистых рыб и видов подсемейства *Clupeinae*. Достоверные различия между ранне- и поздненерестующими частями стада обнаружены не только по целому ряду морфо-физиологических показателей, но и по частотам аллелей локуса *Es-D*, а также средней гетерозиготности и разнообразию генотипов этого локуса, уровень которых был выше в начале хода. Полученные данные по гетерогенности стада дунайской сельди обсуждаются с точки зрения наличия репродуктивно независимых ранне- и поздненерестующих рас сельди.

**Введение.** Важным достижением в области изучения генетических процессов, протекающих в природе, является создание концепции системной организации популяции [1]. Эти представления нашли реальное приложение в теории стада рыб [2, 3], генетическая основа которой детально разработана при изучении популяционной структуры тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* [4].

Основным научным результатом применения концепции к теории стада стало фактическое обоснование положения о том, что локальное стадо — это уникальная, сформировавшаяся на протяжении исторически значительного периода времени, относительно замкнутая генетическая система, состоящая из неоднородных элементов (субпопуляций), что и определяет устойчивость генетической структуры стада во времени и пространстве [1—4].

Особый интерес для дальнейшего развития и практического приложения концепции вызывают проходные рыбы, для стад которых, с одной стороны, характерен выраженный хоминг и, как следствие, изоляция, с другой — явная гетерогенность стада в течение нерестового хода, отражающая его внутреннюю структурированность. Возникает практическая и теоретическая необходимость в распространении знаний, полученных на одних видах рыб, на другие. С этой целью объектом исследования взято дунайское стадо черноморско-азовской сельди *Alosa pontica* — вида, несмотря на его важное научное, природоохранное и промысловое значение, до сих пор не изученного на уровне генных маркеров. Кроме того, сельдь, заходящая на нерест в Дунай, — это, пожалуй, единственное на сегодня стадо проходных рыб Азово-Черноморского бассейна, не утратившее промыслового значения и, следовательно, являющееся уникальной моделью популяционно-генетических исследований рыб этого во многом уникального региона.

Вопросы структуры нерестового стада и проблемы систематики черноморско-азовской сельди привлекали внимание многих ихтиологов, особенно в середине прошлого века [5—9]. Однако результаты, полученные с помощью классических ихтиологических методик, были неоднозначными, и выводы одних авторов подвергались сомнению другими. При этом были вычленены две ключевые проблемы. Первая, это систематические отношения многотычинковой и малотычинковой сельдей, которые, как считается, реп-

родуктивно разобщены. Предполагается, что особи первой формы нерестятся в реках, а второй — в солоноватой воде лиманов. При этом некоторые исследователи [7] считали морфологические и экологические различия настолько убедительными, что придавали этим формам статус отдельных видов, оставляя многотычинковой форме номинативное название *A. pontica*, а малотычинковую именовали азовской (керченской) сельдью *A. maeotica*. Второй проблемой, требующей своего решения, является выяснение причин выраженной биологической гетерогенности нерестовых стад *A. pontica* в течение хода, что может быть объяснено как естественной биологической неоднородностью рыб, приходящих на нерест, так и смешением нескольких локальных стад, нагуливающих в разных частях Черного моря. Так, среди рыб, приходящих на нерест, четко выделяются две группировки [7]: ранненерестящаяся холодолюбивая сельдь, созревающая в 3—5 лет, и теплолюбивая поздненерестящаяся мелкая, способная размножаться уже в двухгодичном возрасте. Эти нерешенные проблемы в полной мере относятся и к сельди Дуная, которая четко разделяется на крупную ранневесеннюю и мелкую весенне-летнюю формы. При этом в выборках дунайской сельди около 6 % особей предварительно можно отнести к *A. maeotica* [7].

К сожалению, однозначные ответы на вопросы о причинах гетерогенности черноморско-азовской сельди, сформулированные еще 50 лет назад, до сих пор не получены, и разные исследователи трактуют систематику и причины гетерогенности нерестовых стад неоднозначно. Причина сложившейся ситуации — отсутствие генетических исследований, что не позволяет решить запутанные вопросы внутривидовой систематики и структурированности нерестового стада этого вида сельди.

Поэтому непосредственной задачей настоящего исследования явился анализ изменчивости биохимических генных маркеров сельдей дунайского стада.

**Материал и методы.** Основу исследования составили 455 экземпляров дунайской сельди, представляющих собой 9 выборок, собранных в 2003 г. подекадно в течение нерестового хода со середины марта до середины июня, а также 365 экз., отловленных в марте—апреле 2004 г.

Электрофоретическому анализу подверглась только свежая мышечная ткань, которая в замороженном состоянии доставлялась в лабораторию. В 2004 г. с целью поиска дополнительных маркеров у 121 экз. была еще исследована кровь и ретина глаза.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле в непрерывной трис-ЭДТА-боратной системе буферов [10] проанализированы девять ферментов: аспаратаминотрансфераза (*Aat*), глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (*G3pdh*), глюкозофосфатизомераза (*Gpi*), лактатдегидрогеназа (*Ldh*), малатдегидрогеназа (*Mdh*), супероксиддисмутаза (*Sod*), фосфоглюкомутаза (*Pgm*), неспецифические эстеразы (*Es*) и умбеллиферил-эстераза (*Es-D*). Кроме того, в мышцах изучались структурные белки (*Pr*), а в крови — гемоглобины (*Hb*) и трансферрины (*Tf*).

Статистическая обработка данных проведена по пакету Statistica. 6 для Windows.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Биохимическая изменчивость. При анализе девяти

Таблица 1  
Аллельные частоты полиморфных локусов у дунайской сельди

Локус	Аллели	Частоты	
		2003 г.	2004 г.
<i>mAat</i>	-100		0,887
	-102		0,113
<i>sAat</i>	90	0,006	
	100	0,994	1,00
<i>Es-D</i>	96	0,036	0,036
	100	0,882	0,913
	104	0,081	0,051
<i>Es-3</i>	98		0,457
	100		0,543
<i>Es-4</i>	100	0,990	0,985
	105	0,010	0,015
<i>G3pdh</i>	100	0,992	1,00
	200	0,008	
<i>Pgm-1</i>	100	0,994	1,00
	103	0,006	
<i>Pr-4</i>	100	1,00	0,997
	167		0,003

Примечание. Локусы *mAat* и *Es-3* в 2003 г. не исследованы.

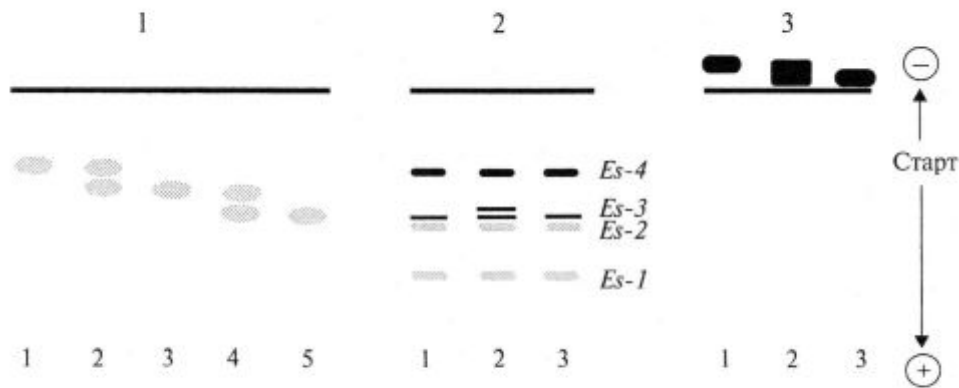


Рис. 1. Электрофоретическая изменчивость: 1 — умбеллиферилэстеразы (*Es-D*); 2 — неспецифических эстераз (*Es-3*); 3 — митохондриальной формы аспаратаминотрансферазы (*mAat*)

Таблица 2

Наблюдаемое и ожидаемое (в скобках) распределения генотипов локуса *Es-D* в популяциях дунайской сельди в течение нерестового хода в 2003 г.

Периоды хода	Распределения генотипов <i>Es-D</i>						$\chi^2$	d.f.
	96/96	96/100	100/100	100/104	104/104	96/104		
Первый	0 (0,4)	17 (14)	138(134,8)	29 (37,6)	8 (2,7)	0 (2,0)	13,08	3
Второй	0 (0,2)	16 (14,4)	220 (219,9)	25 (26,3)	2 (0,8)	0 (0,9)	2,04	3
Ход в целом	0 (0,6)	33 (29,1)	358 (354,3)	54 (65,3)	10 (3)	0 (2,7)	18,85	3

Примечание. Первая половина хода 28.03—20.04, вторая — 20.04—26.06.

Таблица 3

Частоты аллелей и генотипов локуса *Es-D* в первой и второй половинах нерестового хода черноморско-азовской сельди в Дунае в 2003 г.

Частоты	Первая половина (n = 192)	Вторая половина (n = 263)
$p_{96} \pm m$	0,044 ± 0,010	0,03 ± 0,007
$p_{100} \pm m$	0,838 ± 0,019	0,914 ± 0,0125 ***
$p_{104} \pm m$	0,117 ± 0,016	0,055 ± 0,01 ***
$p_{100/100} \pm m$	0,719 ± 0,032	0,836 ± 0,023 **
$p_{104/104} \pm m$	0,042 ± 0,014	0,008 ± 0,005 *
$p_{Hobs} \pm m$	0,240 ± 0,031	0,156 ± 0,023 *

Примечание. Частоты аллелей *Es-D<sup>96</sup>*, *Es-D<sup>100</sup>* и *Es-D<sup>104</sup>*, генотипов *Es-D<sup>100/100</sup>* и *Es-D<sup>104/104</sup>*, а также гетерозигот *Es-D<sup>100/104</sup>* и *Es-D<sup>96/104</sup>* (*Hobs*); m — стандартная ошибка. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

ферментов и спектра структурных белков мышц и крови было идентифицировано 26 локусов: *sAat*, *mAat*, *G3pdh*, *Gpi-1*, *Ldh-A*, *Ldh-B*, *Ldh-C* (последний в ретине глаза), *sMdh-A*, *sMdh-B*, *mMdh*, *sSod*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Es-1*, *Es-2*, *Es-3*, *Es-4*, *Es-D*, *Pt-1*, *Pt-2*, *Pt-3*, *Pt-4*, *Pt-5*, *Hb-1*, *Hb-2*, *Tf*. Из них полиморфными оказались *mAat*, *Es-3* и *Es-D*. Для всех трех локусов характерен пониженный уровень наблюдаемой гетерозиготности по сравнению с ожидаемой. Так, соотношение наблюдаемой ( $H_{obs}$ ) и ожидаемой ( $H_{exp}$ ) составило для *mAat* — 0,16 : 0,20, для *Es-3* — 0,44 : 0,495 и для *Es-D* — 0,19 : 0,21 и 0,13 : 0,16 (в 2003 и 2004 гг. соответственно). По локусам *sAat*, *G3pdh*, *Es-4*, *Pgm-1*, *Pt-4* были обнаружены только единичные гетерозиготы (табл. 1), тогда как остальные локусы были инвариантны.

Локус *mAat* представлен двумя аллелями, продукты которых при данных условиях электрофо-

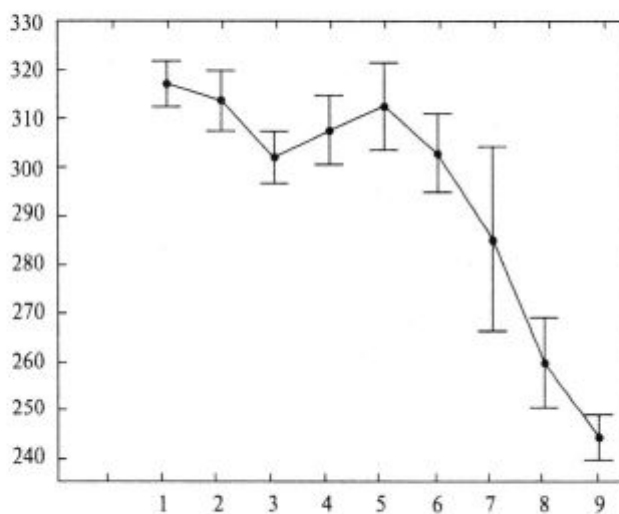


Рис. 2. Изменение средней длины рыб (по вертикали, мм) в течение нерестового хода по декадам. Первый номер выборки соответствует первой декаде марта. Лимитами дается доверительный интервал

реза имеют близкую катодную подвижность (рис. 1).

Локус *Es-D* дунайской сельди имел три аллеля, которые образовывали необычные для этого фермента-димера двухполосные гетерозиготные спектры. Причиной этого могли стать очень незначительные различия аллелей по подвижности (рис. 1), при которых гетеродимер на электрофореграмме просто закрыт гомодимерами, хотя возможно, что мономерная структура фермента — это специфика сельдевых рыб. Проверка соответствия наблюдаемого и ожидаемого распределений генотипов, проведенная в 2003 г. по нерестовому ходу в целом, показала (табл. 2), что в первой его половине явно наблюдается избыток гомозигот *Es-D*<sup>104/104</sup> и дефицит гетерозигот *Es-D*<sup>100/104</sup>, *Es-D*<sup>96/104</sup>, тогда как реальная встречаемость в популяции генотипов *Es-D*<sup>100/100</sup> и *Es-D*<sup>96/100</sup> соответствуют их теоретической частоте. Во второй половине хода различия в наблюдаемом и ожидаемом распределениях генотипов сглаживаются, что сопровождается изменениями генетической структуры стада. Так, в конце нерестового хода снижается доля аллеля *Es-D*<sup>104</sup> и увеличивается частота *Es-D*<sup>100</sup>. При этом происходит уменьшение разнообразия генотипов этого локуса, что проявляется в редукции гетерозиготности и явно большей представленности в популяции самого распространенного генотипа *Es-D*<sup>100/100</sup> (табл. 3).

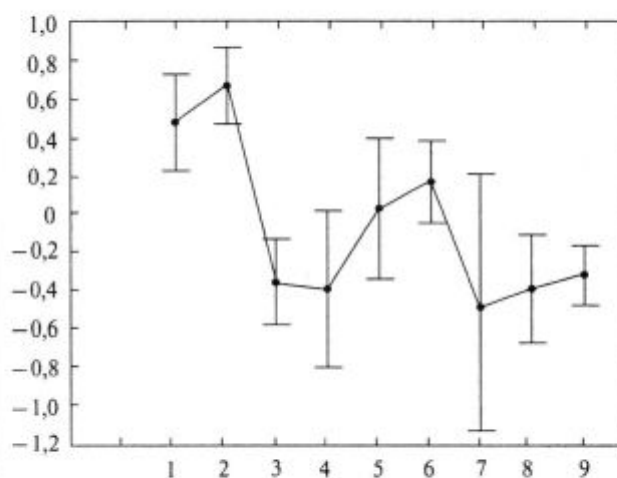


Рис. 3. Изменение относительного темпа роста у рыб разного возраста в течение нерестового хода по декадам. Нормирование проведено для рыб разного возраста и отдельно для самок и самцов

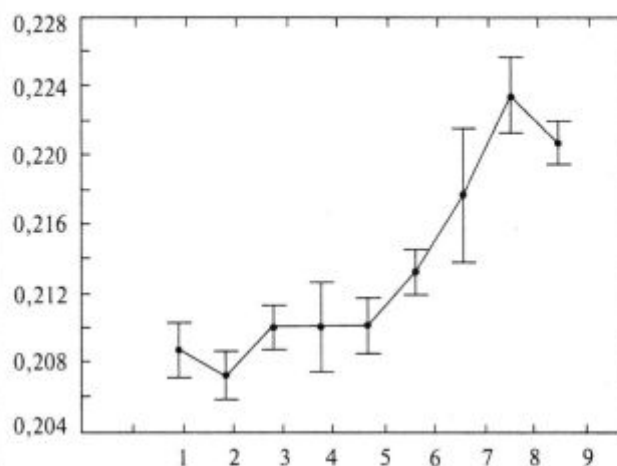


Рис. 4. Изменение длины головы по отношению к длине тела в течение нерестового хода по декадам. Обозначения те же, что и на рис. 2

Достаточно четкую картину изменчивости локуса *Es-3* удалось получить только на материалах 2004 г., когда благодаря специально подобранному режиму электрофореза было достигнуто устойчивое разделение близких по подвижности продуктов локусов *Es-2* и *Es-3*. В результате установлено, что последний представлен двумя аллелями (рис. 1).

Таким образом, средняя наблюдаемая гетерозиготность по 26 проанализированным локусам в популяциях дунайской сельди была незначитель-

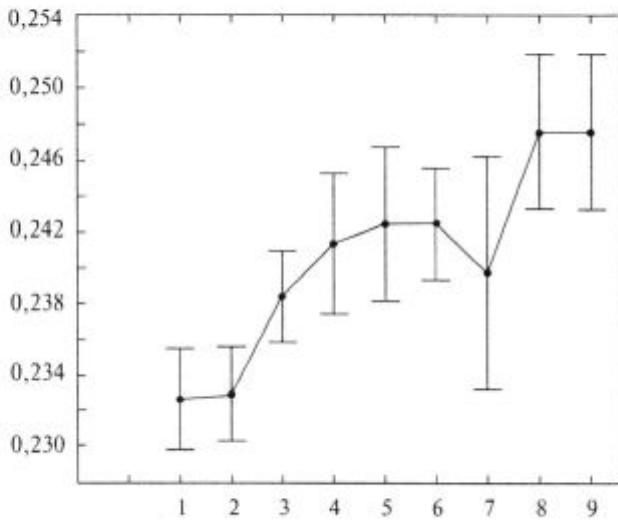


Рис. 5. Изменение относительной высоты тела в течение нерестового хода по декадам (обозначены так же, как и на рис. 2)

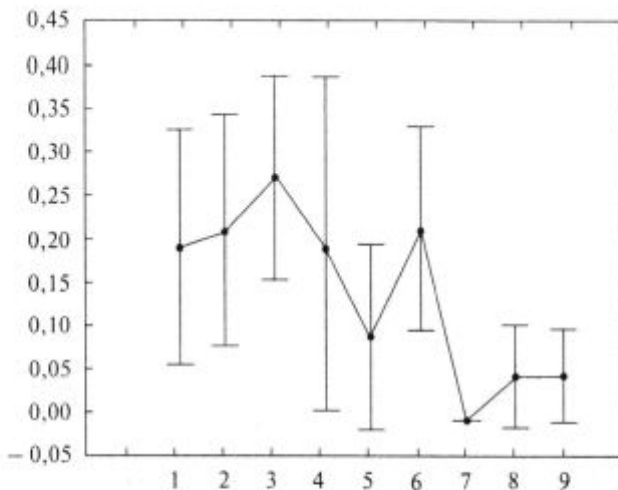


Рис. 6. Средняя частота аллеля *Es-D*<sup>104</sup> в течение нерестового хода по декадам

ной и составила только  $H_{obs} = 0,029$ , а ожидаемая  $H_{exp}$  была чуть выше —  $0,034$ . При этом доля полиморфных локусов составила  $P_{0,05} = 11,5\%$ .

Изменчивость чуть более 3 % гетерозиготных локусов на геном, обнаруженная у черноморско-азовской сельди популяции Дуная, ниже среднего уровня гетерозиготности представителей класса костных рыб. Из соответствующих обзоров [11, 12] можно заключить, что уровень изменчивости популяций костных рыб в среднем составляет 4–5 % гетерозиготных локусов на геном.

К настоящему времени оценки аллозимной изменчивости имеются для семи видов сельдевых подсемейства Clupeinae: у двух видов рода *Clupea* [13], трех рода *Opistonema* [14] и двух *Sardinops* [15, 16]. Только у *S. sagax* гетерозиготность была ниже, чем в дунайском стаде *A. pontica*, и составила 0,011, тогда как у остальных видов номинативного подсемейства она была в пределах 0,052–0,087 (в среднем 0,061), что, кстати сказать, выше среднего костистых рыб. Таким образом, *A. pontica*, единственный представитель подсемейства пузанковых сельдей, изученный на уровне аллозимов, показал незначительный уровень гетерозиготности. Это может быть объяснено тем, что черноморско-азовская сельдь — изолированный узкоареальный вид, начало которому могло дать очень ограниченное число особей, и, кроме того, за свою историю он мог претерпеть неоднократные катастрофические снижения численности, что также должно было привести к редукции генетического разнообразия.

**Структурированность стада.** Исходя из материалов 2003 г., охватывающих весь период нерестового хода, можно заключить, что целый ряд биологических показателей, а также морфологические характеристики рыб в течение сезона имеют устойчивую тенденцию к изменению. В результате по соотношению полов, размерам (рис. 2), темпу роста (рис. 3), возрасту и зрелости гонад, а также некоторым морфометрическим показателям (рис. 4 и 5) ранне- и поздненерестующие популяции дунайской сельди имеют высокодостоверные отличия. Причем среди рыб, приходящих на нерест в марте—апреле, больше самцов, они крупнее и имеют меньшую степень зрелости, у них выше темп роста, относительно крупная голова и высокое тело.

Разнокачественность сельдей первой и второй половин нерестового хода проявляются также и на генетическом уровне (табл. 3). Так, в начале, когда наблюдается достаточно резкий дефицит гетерозигот *Es-D*<sup>100/104</sup> и избыток гомозигот *Es-D*<sup>104/104</sup>, достоверно выше частота аллелей *Es-D*<sup>104</sup> и ниже *Es-D*<sup>100</sup>. Именно в этот период выше гетерозиготность и ниже частота самого представленного в популяции генотипа *Es-D*<sup>100/100</sup> (рис. 6). Полученные достоверные различия даже по одному полиморфному локусу между ранне- и поздненерестующими частями стада как по час-

тотам аллелей, так и по гетерозиготности и разнообразию генотипов в популяции дают основание считать, что дунайская сельдь генетически гетерогенна. Причем в случае наблюдающегося дефицита гетерозиготных и избытка гомозиготных генотипов можно постулировать либо существенную субпопуляционную гетерогенность стада в течение нерестового хода, либо смешение ранне- и поздненерестующих стад сельди, резко отличающихся частотами аллелей полиморфных локусов. Последнее в данном случае более вероятно, особенно если учесть явную двухфазность нерестового хода, подтверждаемую анализом морфо-физиологических показателей и особенно различиями в темпах роста (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют в пользу таксономической однородности стада дунайской сельди, что подтверждается отсутствием в анализированных выборках не только особей — носителей фиксированных альтернативных аллелей, но и качественных различий в мышечном спектре и гемоглобинах, которые, как известно [1], обладают у рыб высокой видоспецифичностью. Тем не менее, основываясь на избытке в популяциях особей с генотипом  $Es-D^{104/104}$  и недостатке гетерозигот  $Es-D^{100/104}$ , можно было бы предположить, что носителями этих гомозигот являются редко встречающиеся в Дунае особи азовской сельди, а дефицитные гетерозиготы  $Es-D^{100/104}$  — гибриды *A. pontica* — *A. taeotica*. Однако это предположение не подтверждается ни анализом числа жаберных тычинок, ни наличием ассоциаций генотипов локуса  $Es-D$  с другими полиморфными маркерами. Кроме того, по двум другим локусам также наблюдается дефицит гетерозигот, что подтверждается наличием эффекта Валлунда, вызванного смешением выборок, которые различаются средними частотами аллелей.

**Выводы.** Проведенное исследование дает основание считать, что черноморско-азовская сельдь — это вид с умеренным уровнем биохимической изменчивости. Нерестовое стадо дунайской сельди является генетически гетерогенным. Причиной этого, вероятнее всего, является наличие репродуктивно изолированных генетически отличных сезонных стад сельди, нагуливающих в разных частях Черного моря, что, прежде всего, подтверждается дефицитом гете-

розигот полиморфных локусов, обычно вызываемым смешением генетически отличных группировок.

**SUMMARY.** Genetic variation and structure of Danube stock of *Alosa pontica pontica* were investigated during the spawning moving by means of biochemical genetic marking. The level of heterozygosity was  $H_{obs} = 0,009$ . It is essentially lower than the average level for populations of other *Teleostei* and *Clupeidae* representatives. Polymorphism was defined only for  $Es-D$  of 20 analyzed loci expressed in muscle tissues. The allele frequencies for this locus were reliably different in the early spawning and later spawning parts of the stock, as well as proportion of heterozygotes and genotype diversity which was higher at the beginning of spawning moving. These results are discussed from two points of view: genetic differences between subpopulations in the course of spawning moving and presence of two close species of herring which come for the spawning together and hybridize to each other.

**РЕЗЮМЕ.** За допомогою біохімічного генного маркування досліджено генетичну мінливість і проведено первинний аналіз структурованості дунайського стада чорноморського оселедця *Alosa pontica* протягом нерестового періоду. З 26 проаналізованих локусів, що мають експресію в м'язах, крові і ретині ока, значний поліморфізм виявили тільки 3 ( $mAat$ ,  $Es-D$  і  $Es-3$ ). Рівні гетерозиготності в популяції склали  $H_{obs} = 0,029$  та  $H_{exp} = 0,034$  відповідно при частині поліморфних локусів —  $P_{0,05} = 11,5\%$ , що значно нижче середнього для популяцій костистих риб і видів підродини *Clupeinae*. Певні відмінності між ранньо- та пізньонерестуючими частинами стада виявлені не тільки по цілому ряду морфо-фізіологічних показників, але і по частотах алелів локуса  $Es-D$ , а також по середній гетерозиготності та різноманіттю генотипів цього локуса, рівень яких був явно вищий на початку ходу. Одержані дані по гетерогенності стада дунайського оселедця обговорюються з точки зору наявності репродуктивно незалежних ранньо- та пізньонерестуючих рас оселедця.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. — М.: Наука, 1989. — 328 с.
2. Алтухов Ю.П. Локальные стада рыб как генетически стабильные популяционные системы // Биохимическая генетика рыб. — Л.: Ин-т цитологии АН СССР, 1973. — С. 43—53.
3. Алтухов Ю.П. Популяционная генетика рыб. — М.: Пищевая промышленность, 1974. — 245 с.
4. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. — М.: Наука, 1997. — 288 с.
5. Световидов А.Н. Сельдевые (Clupeidae). — М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1952. — 331 с. // Фауна СССР. Т. 2. Рыбы. Вып. 1.

6. Павлов П.И. Систематическое положение дунайской сельди // Тр. Ин-та гидробиологии АН УССР. — 1953. — № 28. — С. 9—30.
7. Павлов П.И. Оселдцьові роду *Alosa* північно-західної частини Чорного моря. — К.: Вид-во АН УРСР, 1959. — 252 с.
8. Световидов А.Н. Рыбы Черного моря. — М.; Л.: Наука, 1964. — 336 с.
9. Владимиров В.И. Новая (приустьевая) форма днепровской сельди и некоторые вопросы систематики азовско-черноморской сельди // Зоол. журн. — 1961. — 11, № 4. — С. 547—555.
10. Peacock F.C., Bunting S.L., Queen K.G. Serum protein electrophoresis in acrylamide gel patterns from normal human subjects // Science. — 1965. — 147. — P. 1451—1455.
11. Nevo E., Beiles A., Ben-Shlomo R. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates // Lect. Notes Biomathem. — 1984. — 53. — P. 13—213.
12. Межжерин С.В. Сравнительный анализ аллозимной изменчивости позвоночных животных // Журн. общ. биологии. — 1992. — 53, № 4. — С. 549—556.
13. Grant W.S. Biochemical genetic divergence between Atlantic *Clupea harengus*, and Pacific, *C. pallasii* herring // Copeia. — 1986. — 3. — P. 714—719.
14. Grant W.S. Population genetics of the Southern African pilchard, *Sardinops ocellata*, in the Benguella upwelling system // Int. Symp. Upw. W. Afr., Inst. Univ. Pesq. — Barcelona, 1985. — 1. — P. 551—562.
15. Hedgecock D., Hutchinson E.S., Sly F.L., Nelson K. Genetic and morphometric variation in the Pacific sardine, *Sardinops sagax caerulea*: comparison and contrasts with historical data and with variability in the northern anchovy, *Engraulis mordax* // Fish. Bull. — 1989. — 87. — P. 653—671.
16. Hedgecock D., Nelson K. Biochemical genetic and morphological divergence among three species of thread herring (*Opisthonema*) in Northern Mexico // Cal. Co. F. I. — 1988. — 29. — P. 110—121.

Поступила 28.12.03