

С.В. МЕЖЖЕРИН, Л.В. ФЕДОРЕНКО

Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена НАН Украины
01601 Киев, ул. Б. Хмельницкого, 15
E-mail: mezh@svitonline.com

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА
НЕРЕСТОВОГО СТАДА
ДУНАЙСКОЙ СЕЛЬДИ
ALOSA PONTICA EICHWALDT
1838 (CLUPEIFORMES, ALOSIINAE)**



*Исследование генетической структуры дунайского стада азово-черноморской сельди *Alosa pontica* выполнено по трем полиморфным биохимическим генным локусам. В результате получены доказательства его генетической гетерогенности, которая выражается, во-первых, в неравновесном распределении генотипов локусов, проявляющемся в избытке редких гомозигот и дефиците соответствующих гетерозигот, во-вторых, в различиях частот аллелей между популяциями сельди, приходящими на нерест в марте—апреле и мае—июне. Предполагается, что причины гетерогенности две: интрогрессивная гибридизация между разными формами *A. pontica* и различия между ранне- и поздневесенними расами сельди, имеющими определенную репродуктивную автономность.*

© С.В. МЕЖЖЕРИН, Л.В. ФЕДОРЕНКО, 2005

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2005. № 5

Введение. В настоящее время запасы проходных рыб в Азово-Черноморье находятся в резко депрессивном состоянии: свое значение утратили осетровые, а также днепровское и азовское стада сельди. Промышляется только так называемая дунайская сельдь — раса черноморско-азовской сельди *Alosa pontica* s. l., характеризующаяся ранним нерестом и крупными размерами. Однако и дунайское стадо, судя по уловам за последние 30 лет, уменьшившись в три раза, сократило свою численность [1]. Неслучайно *A. pontica* включена в Красный список МСОП (категория DD) и как подлежащий охране в масштабе Европы вид приводится в III приложении к Бернской конвенции. Очевидно, что изложенные обстоятельства делают исследования этого вида вполне актуальными.

При достаточном числе публикаций по численности и биологической структуре, которые отражают состояние дунайской сельди на протяжении последних 50 лет [2–4], генетическая структура стада и вида в целом до недавнего времени оставалась неизученной, хотя американские и западноевропейские представители рода в этом плане исследованы весьма подробно [5–10]. Только в самое последнее время был определен набор полиморфных биохимических маркеров и установлено, что черноморско-азовская сельдь характеризуется весьма умеренным уровнем аллозимной изменчивости [11]. С точки зрения развития полученных результатов вызывает интерес генетическая структура черноморско-азовской сельди, которая, судя по всему, очень непростая. Помимо трех локальных нерестовых стад (азовское, днепровское и дунайско-днепровское), предполагается наличие в пределах каждого стада по крайней мере двух рас, изолированных друг от друга временем прихода на нерест [12]. Это ранненерестящаяся, крупная и холодолюбивая сельдь, которая, как предполагается [4], зимует в северо-западной части Черного моря, а в мягкие зимы даже встречается непосредственно возле устья Дуная. Массовое созревание особей «крупной» расы происходит в 3–4 года, и на нерест они поднимаются высоко по течению. Вторая раса — это мелкая, поздненерестящаяся сельдь, которая приходит на нерест во второй половине апреля и созревает в 2–3 года. Нагуливается эта сельдь, по-видимому, в южной части Черного моря и не имеет

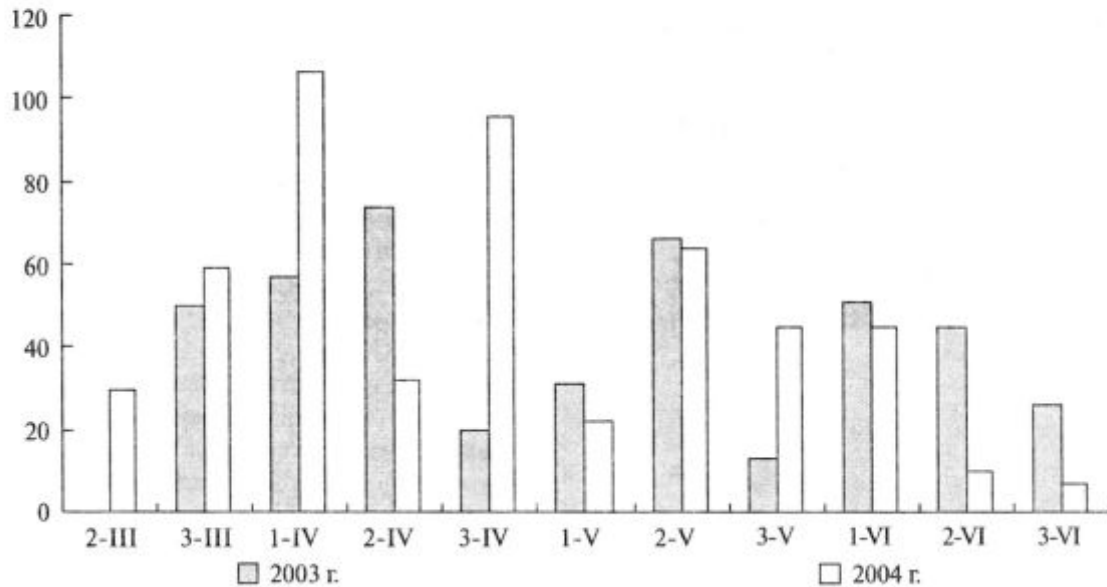


Рис. 1. Объемы подекадных выборок сельдей (n — по вертикали) за период нерестового хода

такого длительного нерестового хода в реке, как крупная форма. Многокомпонентность структуры нерестовых стад обнаружена также у других видов проходных рыб [13—15] и связана она с наличием локальных стад, имеющих свои нагульные ареалы и вследствие этого разную удаленность от мест нереста и неодинаковое время созревания.

Установлено [13], что локальные стада проходных видов рыб имеют вполне определенные генетические различия, обусловленные их достаточно древней историей формирования, а также пространственно-временной автономией, ограничивающей генные потоки. Именно поэтому нерестовые стада рыб считаются единицами воспроизводства и промысла. Каждое локальное стадо представляет собой генетически уникальную систему [13], отличающуюся от других частотами генных маркеров. Предполагаемая многокомпонентность стада дунайской сельди до сих пор на генетическом уровне не доказана. Ведь указанная выше разнокачественность сельдей обусловлена приходом на нерест разновозрастных групп, а потому может быть объяснена неодинаковой скоростью созревания старых и молодых рыб, что в действительности имеет место и у других видов, например у кеты (*Onchorhynchus keta*) [15], когда вначале на нерест приходят более возрастные особи. Ответ на вопрос о причинах гете-

рогенности стада дунайской сельди может быть получен только после анализа изменчивости генных маркеров, когда, возможно, будут установлены различия в генных частотах в течение нерестового хода или, по крайней мере, на основе неравновесного характера распределения генотипов доказано смешение разных генетических группировок.

Материал и методы. Основой исследования послужили две серии выборок дунайского стада сельди, взятые в устьевой части Дунайских гирл (Полуденное, Быстрое, Восточное, Большое) сетевым ловом на протяжении всего нерестового сезона. Характер хода в 2003 и 2004 г. несколько отличался. В 2003 г. первую выборку удалось взять только в третьей декаде марта, а в 2004 г. раньше — во второй. При этом в 2003 г. массовый ход продолжался почти до конца июня, тогда как в 2004 г. получение материала уже со второй декады этого месяца было проблематичным. Очевидно, из-за погодных особенностей 2004 г. нерестовый ход начался раньше, но закончился позже. В 2003 г. было генетически промаркировано 433, а в 2004 г. — 545 особей. Выборки в течение сезона были неравнозначными по объему и очевидно отражали численность сельди в конкретный период хода (рис. 1), хотя следует учесть, что в конце нереста при добыче материала приходилось прилагать дополнитель-

ные усилия, а потому выборки конца сезона не отражают реальную численность рыб, приходящих в это время на нерест. Для последующего анализа выборки объединяли подекадно.

Для проведения генного маркирования от каждой рыбы брали мышечную ткань. Электрофоретический анализ проводили в 7,5%-ном полиакриламидном геле в непрерывной системе буферов [16]. Проанализированы три полиморфных локуса, кодирующих соответственно умбеллиферилэстеразу (*Es-D*), митохондриальную форму аспартатаминотрансферазы (*Aat-2*) и одну из неспецифических эстераз (*Es-3*). Электрофоретическая картина изменчивости этих ферментов детально описана ранее [11].

Результаты исследований. Особенности генетической структурированности стада дунайской сельди оценены двумя известными способами: по соотношению наблюдаемых и ожидаемых на основе закона Харди-Вайнберга распределений генотипов и динамике генных частот в течение нерестового хода.

Локус *Es-D*. Изменчивость этого локуса, представленного тремя аллелями, проанализирована в 2003 и 2004 гг. И в том, и в другом сезоне отмечен явный дефицит гетерозигот *Es-D*^{100/104}, *Es-D*^{96/104} и избыток гомозигот *Es-D*^{104/104} при равенстве соотношений генотипов: *Es-D*^{100/100}, *Es-D*^{96/100} и *Es-D*^{96/96} (таблица). Из-за того что нарушения распределений наблюдаются по редко встречающимся генотипам, сопоставление эмпирического и теоретического распределений проведено только в объединенной выборке. Расчеты показали, что действительно различия между распределениями генотипов статистически высоко достоверны ($\chi^2 = 54,64$; d.f. = 3; $p < 0,001$) и касаются прежде всего избытка гомозигот *Es-D*^{104/104}.

Анализ динамики частот аллелей этого локуса в объединенной выборке показал направ-

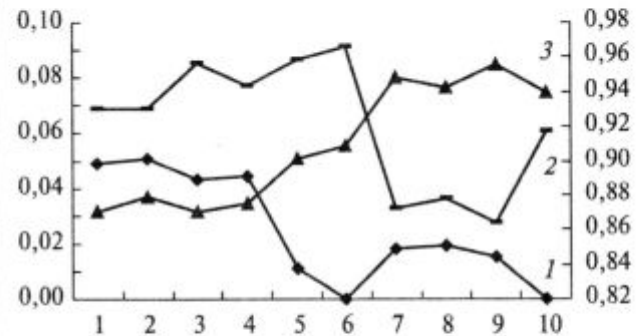


Рис. 2. Динамика частот аллелей локуса *Es-D* в течение нерестового хода в объединенной выборке за 2003—2004 гг.: 1 — аллели *Es-D*⁹⁶, 2 — *Es-D*¹⁰⁴; 3 — *Es-D*¹⁰⁰; по горизонтали — порядковый номер выборки, по вертикали слева — частоты аллелей *Es-D*⁹⁶ и *Es-D*¹⁰⁴, справа — частота аллеля *Es-D*¹⁰⁰

ленные изменения генетической структуры популяции в течение хода и существенную гетерогенность декадных выборок. Так, встречаемость аллеля *Es-D*¹⁰⁴ явно снижалась по мере нерестового хода (рис. 2). Если в его первой половине (выборки № 1—6) средняя частота этого аллеля составляла $0,08 \pm 0,008$, то к концу она упала ровно в два раза — до $0,04 \pm 0,008$ ($t = 3,64$; $p < 0,001$). Аналогичную тенденцию наблюдали и по аллелю *Es-D*⁹⁶, частота которого также снижалась в течение нерестового сезона (рис. 2). В период рунного хода в марте—апреле (выборки 1—4) его частота ($0,05 \pm 0,007$) в пять раз выше, чем во второй половине ($0,01 \pm 0,003$), а это значит, что различия между ранне- и позднерестующимися частями стада по частоте и этого аллеля высоко достоверны ($t = 5,26$; $p < 0,001$). Очевидно, что по ходу нереста встречаемость самого распространенного аллеля *Es-D*¹⁰⁰ будет, наоборот, увеличиваться. И действительно (рис. 2), если в марте—апреле его частота была $0,87 \pm 0,011$, то в мае—июне она увеличилась до $0,93 \pm 0,008$

Наблюдаемое и ожидаемое (в скобках) распределения генотипов локуса *Es-D* в нерестовом стаде дунайской сельди

Год	Генотипы					
	96/96	96/100	100/100	100/104	104/104	96/104
2003	0 (0,6)	33 (29,1)	358 (354,3)	54 (65,3)	10 (3)	0 (2,7)
2004	1 (0,4)	26 (25,8)	447 (441,6)	34 (46,2)	8 (1,2)	0 (1,4)
В целом	1 (0,9)	59 (54,5)	805 (795,3)	88 (112)	18 (4)	0 (3,9)

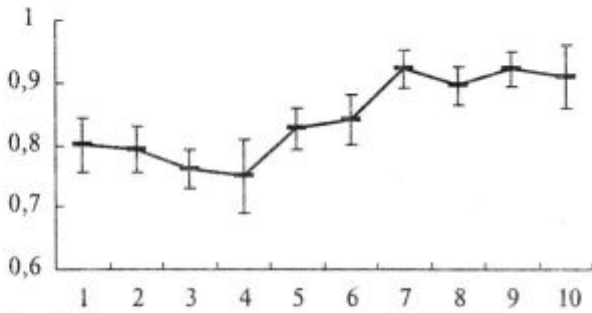


Рис. 3. Средняя частота генотипа *Es-D^{100/100}* и ее стандартная ошибка (по вертикали) в течение нерестового хода; по горизонтали — порядковый номер выборки

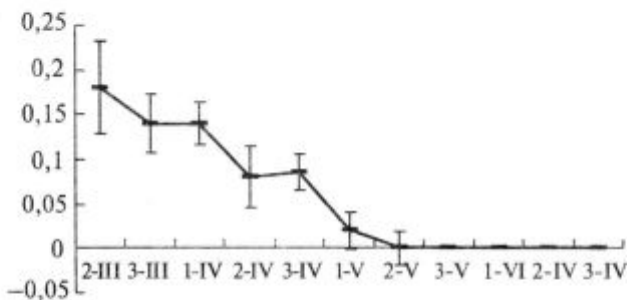


Рис. 4. Динамика средней частоты аллеля *Aat-2¹⁰²* (по вертикали) по мере нерестового хода; по горизонтали — декады

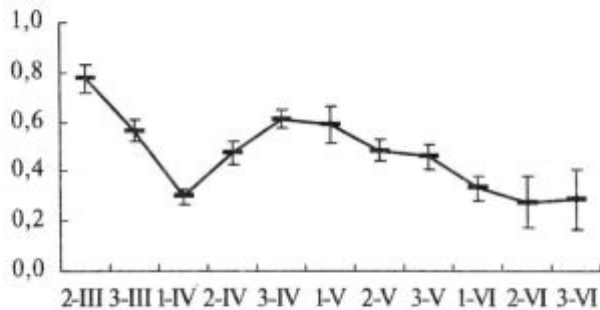


Рис. 5. Динамика средней частоты аллеля *Es-3¹⁰²* по мере нерестового хода. Обозначения те же, что и на рис. 4

($t = 3,93$; $p < 0,001$). Следует подчеркнуть, что накопление этого аллеля в выборках, взятых по нерестовому ходу, происходит поступательно, что и подтверждает ранговый показатель связи ($r = 0,92$, $p < 0,001$). Из увеличения частоты преобладающего аллеля *Es-D¹⁰⁰* следует нарастание основного генотипа *Es-D^{100/100}* (рис. 3), вследствие чего по этому локусу к концу хода происходит снижение генетического разнообразия.

Проведенный анализ генетической структуры в двух независимых сериях выборок, соб-

ранных в разные годы, показал общие тенденции, которые ранее были обнаружены [11] на материалах сезона 2003 г., а именно: дефицитность гетерозигот *Es-D^{100/104}* и *Es-D^{96/104}* и избыточность гомозиготы *Es-D^{104/104}*; нарастание по нерестовому ходу частоты аллеля *Es-D¹⁰⁰* и соответственно уменьшение представленности альтернативных аллелей; увеличение частоты встречаемости основного генотипа *Es-D^{100/100}* и как следствие этого гомозиготизация позднерепродуцирующих рыб.

Локус *Aat-2*. Этот полиморфный локус представлен двумя резко отличными по встречаемости аллелями, образующими три генотипа, наблюдаемое и ожидаемое (в скобках) распределения которых не соответствуют друг другу:

<i>Aat-2^{100/100}</i>	417 (408,3)
<i>Aat-2^{100/102}</i>	63 (40,0)
<i>Aat-2^{102/102}</i>	12 (3,9)

Как и в случае с локусом *Es-D*, достоверно избыточной является редкая гомозигота *Aat-2^{102/102}* и дефицитной соответствующая гетерозигота *Aat-2^{100/102}*, что и подтверждают расчеты ($\chi^2 = 13,93$; d.f. = 1; $p < 0,001$) (рис. 4).

Также очевидным является и уменьшение по мере нерестового хода встречаемости более редкого аллеля *Aat-2¹⁰²*. Его появление четко приурочено к первой половине хода. Так, в марте и начале апреля его частота была $0,153 \pm 0,018$, со середины апреля по середину мая составила только $0,062 \pm 0,011$, а в последующих выборках этот аллель не отмечался вообще.

Локус *Es-3*. Представлен двумя аллелями, встречающимися в равной пропорции, они образуют три генотипа, и их эмпирические распределения не противоречат закону Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 2,12$; d.f. = 2; $p > 0,05$):

<i>Es-3^{98/98}</i>	146 (136,8)
<i>Es-3^{98/100}</i>	260 (278)
<i>Es-3^{100/100}</i>	150 (141,2)

Тем не менее в течение хода имела место явная неоднородность частот встречаемости аллелей, которая сопровождалась уменьшением представленности аллеля *Es-2¹⁰²*, что и подтверждает показатель связи между порядковым номером выборки и частотой этого аллеля ($k = -0,84$; $p < 0,01$) (рис. 5). На первый взгляд эта тенденция не выглядит такой уж убедитель-

тельной, как по другим локусам, поскольку во время самого массового хода (первая декада апреля) наблюдали явный избыток генотипов $Es-2^{100/100}$ и некоторый дефицит $Es-2^{102/102}$ ($\chi^2 = 11,80$; d.f. = 2; $p < 0,001$), приводящий к резкому увеличению частоты аллеля $Es-3^{100}$. В остальных же декадных выборках распределение генотипов не отличалось от равновесного.

Обсуждение полученных данных. В результате анализа распределений генных частот полиморфных биохимических локусов, проведенного в течение двух сезонов, стала очевидной генетическая гетерогенность стада дунайской сельди, которая проявляется в течение нерестового хода. При этом можно выделить два аспекта гетерогенности: избыток определенных редких гомозигот в начале и плавные изменения частот аллелей в течение всего хода.

Избыток гомозигот и дефицит соответствующих гетерозигот наблюдали в первой половине нереста — в период рунного хода, что, по-видимому, вызвано смешением как минимум двух групп особей, резко отличающихся по численности и характеризующихся тенденциями к фиксации альтернативных аллелей. Если судить по доле избыточных гомозигот в изученных выборках, которая для генотипа $Es-D^{104/104}$ колеблется по сезонам от 1,6 до 2,2 %, а для $Aat-2^{-102/-102}$ по материалам сезона 2004 г. составляет 2,5 %, то на меньшую по численности группировку приходится не более 5 % особей всего стада.

Внутривидовая систематика черноморско-азовских сельдей, в частности дунайской, была предметом постоянных дискуссий и до сих пор во многом остается неясной. Еще в начале XX века румынский исследователь Г. Антипа выделял три варианта черноморско-азовских сельдей, группирующихся в дунайском районе, причем каждая из трех форм имела свой путь миграции, место и срок икрометания. Позднее Павлов [8] подверг ревизии эту точку зрения и выделил два полноценных вида — собственно черноморско-азовскую *A. pontica* s. str. и керченскую *A. maeotica* сельди, которые имели четкий морфологический диагноз, основанный на числе жаберных тычинок. Кроме того, в пределах *A. pontica* s. str. он рассматривал проходную «дунайку» и непроходную «морячку», которая встречалась гораздо реже первой. Четкие морфологические признаки,

диагностирующие эти две формы, им не описаны, а их реальность он доказывал, основываясь на морфо-физиологических характеристиках особей из приустьевой части Дуная. Перечисленные факты дают основания считать, что обнаруженные нарушения распределений генотипов, связанные с дефицитом определенных гетерозигот и избытком гомозигот, обусловлены смешением двух или более внутривидовых форм. И такое предположение вполне реально, ведь установлено [14], что даже экологически и морфологически различные виды европейских сельдей, как алоза (*A. alosa*) и финта (*A. fallax*), гибридизируют друг с другом. При этом гибридизация носит интрогрессивный характер, что размывает морфологический hiatus между родительскими видами и делает очень проблематичной не только диагностику гибридов, но даже родительских видов по экстерьерным признакам. Поэтому вполне вероятно, что и в Дунае происходит гибридизация между различными формами в пределах *A. pontica* или даже между *A. pontica* — *A. maeotica*, частота встреч которой среди дунайской сельди даже в прошлом составляла не более 6 % [8].

Подразделенность нерестового стада во время нерестового хода описана у очень многих видов проходных рыб, причем дифференциация стада на раннюю (весеннюю) и позднюю (весенне-летнюю) расы, как у дунайской сельди, известна у нерки (*Onchorhynchus nerka*) [4] и подтверждается генетическим и биологическим анализами. И в случае с дунайским стадом сельди объективность выделения сезонных рас подтверждают не только параметры биологической структуры (размеры, возраст и соотношение полов) и особенности морфологии [5], но и генетические, в частности, различия между ранне- и позднерестующими частями стада по частотам аллелей $Es-96$ и $Es-2^{102}$.

Следует сказать, что генетические различия между популяциями в течение хода можно было ожидать *a priori*. Ведь ранневесенняя часть дунайского стада идет на нерест при температуре воды 5 °С, тогда как майско-июньская сельдь заходит в реку при температуре явно выше 20 °С. Такие различия в условиях нереста особей одного вида рыб просто уникальны и должны сопровождаться приспособлениями на молекулярно-генетическом уровне.

В заключение еще раз необходимо подчеркнуть, что локальные стада рыб [1] — это не панмиктические группировки особей, а генетически упорядоченные системы, гетерогенность которых четко проявляется при нерестовом ходе. Это концептуальное положение полностью подтверждается и в случае с дунайской сельдью. Во-первых, биологическая структура этого стада меняется в течение нерестового хода, а во-вторых, сельдь Дуная не является генетически однородной группировкой, что следует из характера распределения частот аллелей в течение нерестового хода.

SUMMARY. The genetic structure of the population of Danube shad, *Alosa pontica*, has been studied by means of analysis of 3 polymorphic biochemical gene loci. The results of the study provide evidence of its genetic heterogeneity which is expressed by: firstly, an unbalanced ratio of genotype loci manifested by an excess of rare homozygotes and deficit of the corresponding heterozygotes, and secondly, differences in the allele frequencies between shad populations arriving for spawning in March-April and May-June. It is suggested that there could be two causes of heterogeneity: one due to the introgressive hybridization between various forms of *A. pontica* and another to the differences between early and late spring races of shad which to a certain extent are reproductively autonomous.

РЕЗЮМЕ. Дослідження генетичної структури дунайського стада азово-чорноморського оселедця *Alosa pontica* виконано по трьох поліморфних біохімічних генних локусах. В результаті одержано докази його генетичної гетерогенності, яка відображається, по-перше, в нерівноважному розподілі генотипів локусів, що виявляє себе в надлишку рідкісних гомозигот та дефіциті відповідних гетерозигот, по-друге, у відмінностях частот алелей між популяціями оселедця, що приходять на нерест в березні—квітні та у травні—червні. Припускається, що є дві причини гетерогенності: інтрогресивна гібридизація між різними формами *A. pontica* та відмінності між ранньо- та пізньовесняними расами оселедця, що мають певну репродуктивну автономію.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Navodaru I. Evolution of Pontic Shad Stock (*Alosa pontica*) in New Environmental Conditions and Measures for Enhancement. — PhD thesis, Galati University, 1997. — P. 58.
2. Бушуев С.Г. Современные данные о состоянии нерестового стада дунайской сельди, *Alosa kessleri pontica* Eichw., в 1994—1995 годах // Тр. ЮГНИРО. — Керчь, 1996. — С. 254—258.
3. Мороз В.Н. Характеристика состояния нерестового стада дунайской сельди *Alosa kessleri pontica* Eichw. в 1963—1967 гг. // Вопр. ихтиологии. — 1969. — 9, вып. 4 — С. 640—650.
4. Павлов П.И. Биологическая и промысловая характеристика нерестового стада дунайской сельди // Тр. Ин-та гидробиологии АН УССР. — 1953 — № 28. — С. 118—173.
5. Alexandrino P., Ferrand N., Rocha J. Genetic polymorphism of a hemoglobin chain and adenosine deaminase in European shads: evidence for the existence of two distinct genetic entities with natural hybridization // J. Fish Biol. — 1996. — 48. — P. 447—456.
6. Bentzen P., Leggett W.C., Brown G.G. Genetic relationships between the shads (*Alosa*) revealed by mitochondrial DNA analysis // J. Fish Biol. — 1993. — 43. — P. 909—917.
7. Boisneau P., Mennesson-Boisneau C., Guyomard R. Electrophoretic identity between allis shad *Alosa alosa* L. and twaite shad, *Alosa fallax* (Lacepede) // J. Fish Biol. — 1992. — 40. — P. 731—738.
8. DeWoody J.A., Avise J.A. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals // J. Fish Biol. — 2000. — 56. — P. 461—473.
9. Faria R., Wallner B., Weiss S., Alexandrino P. Isolation and characterization of eight dinucleotide microsatellite loci from two closely related clupeid species (*Alosa alosa* and *A. fallax*) // Mol. Ecol. Notes. — 2004. — N 4. — P. 586—588.
10. Waters J.M., Epifanio J.M., Gunter T., Brown B.L. Homing behaviour facilitates subtle genetic differentiation among river populations of *Alosa sapidissima*: microsatellites and mtDNA // J. Fish Biol. — 2000. — 56. — P. 662—636.
11. Межжерин С.В., Федоренко Л.В. Биологическая и генетическая структурированность стада Черноморско-Азовской сельди *Alosa pontica* Дуная // Экологічні проблеми Чорного моря. — Одеса : ОЦНТЕПІ, 2004. — С. 467—473.
12. Павлов П.И. Оселедцьові роду *Alosa* північно-західної частини Чорного моря. — К. : Вид-во АН УРСР, 1959. — 252 с.
13. Алтухов Ю.П. Локальные стада рыб как генетически стабильные популяционные системы // Биохимическая генетика рыб. — Л., 1973. — С. 43—53.
14. Алтухов Ю.П. Популяционная генетика рыб. — М.: Пищ. промышленность, 1974. — 247 с.
15. Коновалов С.М. Популяционная биология тихоокеанских лососей. — Л.: Наука, 1980. — 238 с.
16. 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.

Поступила 12.04.05