

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И АЛЛОЗИМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПУЗАНКОВЫХ СЕЛЬДЕЙ РОДА *ALOSA* (*CLUPEIFORMES*, *ALOSIINAE*) АЗОВО-ЧЕРНОМОРСКОГО БАССЕЙНА



Биохимическое генное маркирование черноморско-азовских сельдей (*Alosa immaculata*, *A. caspia*, *A. taeotica*) трех локальных стад — дунайского, днепровского и азовского — проведен на основе анализа изменчивости 19 ферментных локусов и серии локусов, кодирующих структурные белки мышц. В результате доказана высокая степень мономорфизма и отсутствие каких-либо отличий в аллельных пулах, что подтверждает точку зрения об их конспецифичности. Вероятнее всего, что пузанки, бражниковые и проходные сельди — это только морфологически дискретные формы, которым необоснованно присвоили ранг вида. На самом деле это ни что иное, как жилые и проходные экоморфы, почти всегда встречающиеся у анадромных рыб.

Введение. В последнее время пузанковые сельди Европы стали объектом серий популяционных и эволюционно-генетических исследований, выполненных разными научными школами. Задачами этих работ [1–8] было исследование структуры отдельных нерестовых стад, уточнение систематики рода, определение статуса внутривидовых форм.

В первой же работе [3], посвященной генетическим взаимоотношениям атлантических европейских видов пузанковых сельдей — алозы *Alosa alosa* и финты *A. fallax*, установлен их мономорфизм и неразличимость по 22 локусам, кодирующим ферменты и структурные белки, что дало основание для предположения о конспецифичности этих, как традиционно считалось у ихтиологов, «хороших» видов. Дальнейшее изучение их генетических взаимоотношений, предпринятое путем анализа полиморфизма рестриктных сайтов мтДНК, привело к явно неоднозначным выводам: алоза и финта — это либо две дивергировавшие группы одного вида, либо два гибридизирующих вида [4].

Расширение числа локусов, а также применение тонких методов электрофоретического разделения ферментов и белков позволило в дальнейшем португальским исследователям [5, 6] выявить полиморфные локусы и представить доказательства в пользу того, что это разные виды, между которыми, однако, идет интрогрессивная гибридизация. Тем не менее факт присутствия в популяциях у средиземноморской финты, изолированной исторически и географически от атлантической алозы, генетических элементов последней ставит под сомнение их самостоятельный видовой статус и предполагает наличие двух достаточно дивергировавших внутривидовых форм. Дальнейшие исследования пузанковых сельдей, выполненные на уровне нуклеотидных замещений ДНК и проведенные на ограниченном числе особей, дали еще более неоднозначные результаты [7]. С одной стороны, вроде бы была обнаружена значительная нуклеотидная дивергенция между *A. alosa* и *A. fallax*, а с другой — не удалось провести четкую генетическую границу между последней и черноморско-азовской сельдью *A. immaculata* (= *pontica*). Более того, в этой работе установлено, что черноморско-азовская сельдь совсем не отличается от пузанка *A. caspia*, который всегда и безусловно считался отдельным видом. Похожие результаты с помо-

щью секвенирования мтДНК получены и американскими исследователями [8], которыми была доказана необычайно высокая тесная связь европейских видов *A. alosa* — *A. fallax* — *A. immaculata*, что также подтверждает конспецифичность европейских пузанковых. Неоднозначные результаты дали и предварительные электрофоретические исследования белков и ферментов сельди и пузанка, также проведенные на ограниченном числе особей [9]. У выделенных морфологических форм пузанка и сельди наблюдались определенные различия в спектрах, но вместе с тем они были связаны не с фиксациями альтернативных аллелей, а только с появлением дополнительных фракций, что возможно в случае так называемых дуплицированных локусов у аллоплоидных видов, представляющих сетку гибридных форм. Однако пузанковые сельди, судя по числу хромосом [10] и размеру генома [11], в отличие от других палеарктических проходных — лососевых и осетровых — не являются аллополиплоидами. Таким образом, после серии проведенных генетических исследований ситуация с систематикой европейских сельдей стала еще более неоднозначной.

Дополнительные проблемы при попытке определиться с видовым составом сельдей Азово-Черноморского бассейна возникают еще и потому, что их систематика, даже построенная на морфологических признаках, до сих пор остается дискуссионной. Если все ихтиологи признают существование солоноватоводного пузанка *A. caspia* и проходной сельди черноморско-азовской *A. immaculata*, то реальность третьего морского вида сельди керченской *A. maotica* до сегодняшнего дня остается под сомнением: одни авторы [12–14 и др.] приводят керченскую сельдь как отдельный вид, а другие [15–17] считают ее отдельной экоморфой или подвидом сельди черноморско-азовской. Такие противоречия во взглядах на систематику этих видов неслучайны, поскольку форма тела, приводимая для пузанковых сельдей как основной диагностический признак, на самом деле является весьма субъективным, а число жаберных тычинок — изменчиво и трансгрессирует при сравнениях предполагаемых видов. Поэтому цель настоящего исследования состояла в определении аллозимной изменчивости

трех указанных видов понтических сельдей, акцентированном на подтверждении их межвидовой дифференциации, а в случае их эволюционно-генетической дискретности — на наличии между ними гибридизации.

Материал и методы. Основой исследования послужили серии сельдей, собранные в течение 2003–2007 гг. и представляющие три основных локальных стада Азово-Черноморья. Сельдь черноморско-азовская *A. immaculata* (= *pontica*) представляет три локальных стада: дунайское (105 экз.), днепровское (10 экз.) и донское (22 экз.) Выборки соответственно взяты из Дуная, Днепра в период нерестового хода и из Керченского пролива (в период осенне-зимней миграции). Пузанок исследован в тех же трех бассейнах: так называемый азовский пузанок *A. c. caspia* (7 экз.) взят в Керченском проливе, дунайский *A. c. tanaica* — в Дунае (45 экз.) и Днепровско-Бугском (10 экз.) лимане. Выборка керченской сельди *A. maotica* (9 экз.) получена непосредственно из Керченского пролива. К этому виду отнесены особи с числом жаберных тычинок на первой дуге от 33 до 39.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле исследована изменчивость девяти ферментов, проанализированных в мышечной ткани: аспаратаминотрансфераза (*Aat*), глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (*G3pdh*), глюкозофосфатизомераза (*Gpi*), лактатдегидрогеназа (*Ldh*), малатдегидрогеназа (*Mdh*), супероксиддисмутаза (*Sod*), фосфоглюкомутаза (*Pgm*), неспецифические эстеразы (*Es*) и умбелеферилэстераза (*Es-D*). Кроме того, исследован спектр белков мышц (*Pt*), окрашиваемых на общий белок.

Результаты исследований и их обсуждение. При электрофоретическом анализе девяти ферментов и спектра мышечных белков определено 17 энзимных локусов и пять локусов структурных белков мышц. Как указывалось ранее для финты и алозы [3], а также для дунайского стада черноморско-азовской сельди [1], популяции пузанковых на уровне изменчивости аллозимов очень консервативны (рис. 1). При этом локусы трех предполагаемых понтических видов *Gpi*, *G3pdh*, *Pgm-2*, *Es-1*, *Es-2*, *Ldh-A*, *Ldh-B*, *Mdh-1A*, *Mdh-1B*, *Mdh-2*, *Sod-1*, *Pt-1*, *Pt-2*, *Pt-3*, *Pt-5* выявились инвариантными, а *Aat-1*, *Aat-2*, *Es-3*, *Es-4*, *Es-D*, *Pgm-1*, *Pt-4* имели большей частью редкие альтернативные аллель-

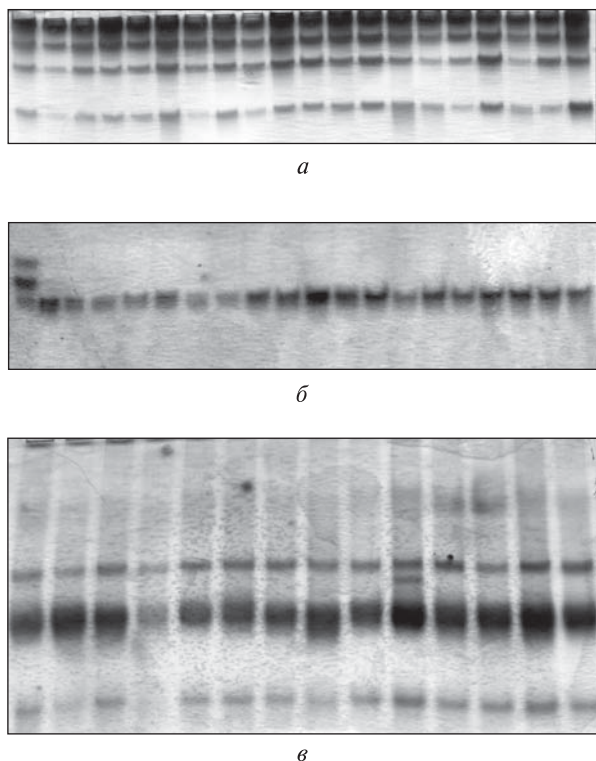


Рис. 1. Изменчивость электрофоретических спектров ферментов пузанковых: а – лактатдегидрогеназы (*Ldh-A, B*); б – аспаратаминотрансферазы (*Aat-1*); в – неспецифических эстераз (*Es-1–3*). Старт сверху

Аллозимная изменчивость пузанковых сельдей
Азово-Черноморского бассейна

Локус	Аллель	<i>A. immaculata</i> , <i>n</i> = 137	<i>A. c. tanaica</i> , <i>n</i> = 7	<i>A. c. nordman</i> , <i>i</i> = 55	<i>A. maeotica</i> , <i>n</i> = 9
<i>Aat-1</i>	90	0,01		0,01	
	100	0,99	1,00	0,99	
<i>Aat-2</i>	–100	0,89	1,00	1,00	1,00
	–102	0,11			0,09
<i>Es-3</i>	98	0,45	0,43	0,44	0,44
	100	0,55	0,57	0,46	0,56
<i>Es-4</i>	100	0,99	1,00	1,00	0,94
	105	0,01			0,06
<i>Es-D</i>	96	0,04		0,02	
	100	0,91	1,00	0,94	0,89
	104	0,05		0,04	0,11
<i>Pgm-1</i>	100	0,99	1,00	0,98	1,00
	103	0,01		0,02	
<i>Pt-4</i>	100	0,99	1,00	1,00	1,00
	167	0,01			

ные варианты, причем набор этих полиморфных локусов был практически одинаков у всех трех сравниваемых видов (таблица).

По причине высокой изменчивости и неопределенности диагноза исследованных видов пузанковых принципиальным моментом исследования стало доказательство правильности отнесения исследованных особей к одному из трех видов. С этой целью проведен специальный анализ изменчивости числа жаберных тычинок у рыб, имевших «сельдеобразную» и «пузанкообразную» форму тела. Этот признак чаще всего и выделяется в качестве ключевого диагностического для *A. immaculata* и *A. caspia*.

В Дунае у рыб с «пузанкообразной» формой тела число жаберных тычинок колеблется в пределах от 51 до 93, а у «сельдеобразной» – 39–77 (рис. 2), что свидетельствует о значительной трансгрессии этого признака у исследованных рыб и невозможности его использования в качестве диагностического. При этом пузанки с наименьшим числом тычинок по размерам были самыми крупными и по форме тела приближались к сельдям, а значит по формальным соображениям, базирующимся на анализе экстраерных признаков, должны интерпретироваться как гибриды *A. immaculata* × *A. caspia*, что, однако, не подтверждается данными генного маркирования. Симптоматично также отсутствие в Дунае сельдей с числом тычинок, явно меньшим 40, которых можно было бы рассматривать как *A. maeotica* и которые ранее здесь ежегодно отмечались [12].

В Днепре всегда было трудно провести границу между сельдью и пузанком. При этом здесь выделялись две формы сельдей – много- и малотычинковые [12]. Возможно поэтому отдельные исследователи не разделяли днепровских пузанковых на два вида и давали им общую морфологическую характеристику [17]. Тем не менее, вероятно, из-за небольшого объема исследованных выборок между пузанками и сельдями можно по числу жаберных тычинок провести четкую границу (рис. 3).

Особый интерес вызывает азовская выборка, где присутствовали сельди с числом тычинок существенно ниже 40, которые могут быть интерпретированы как *A. maeotica*. Здесь же обнаружены, судя по числу жаберных тычинок, типичные *A. immaculata* и *A. caspia*. В целом же распределение числа жаберных тычинок в со-

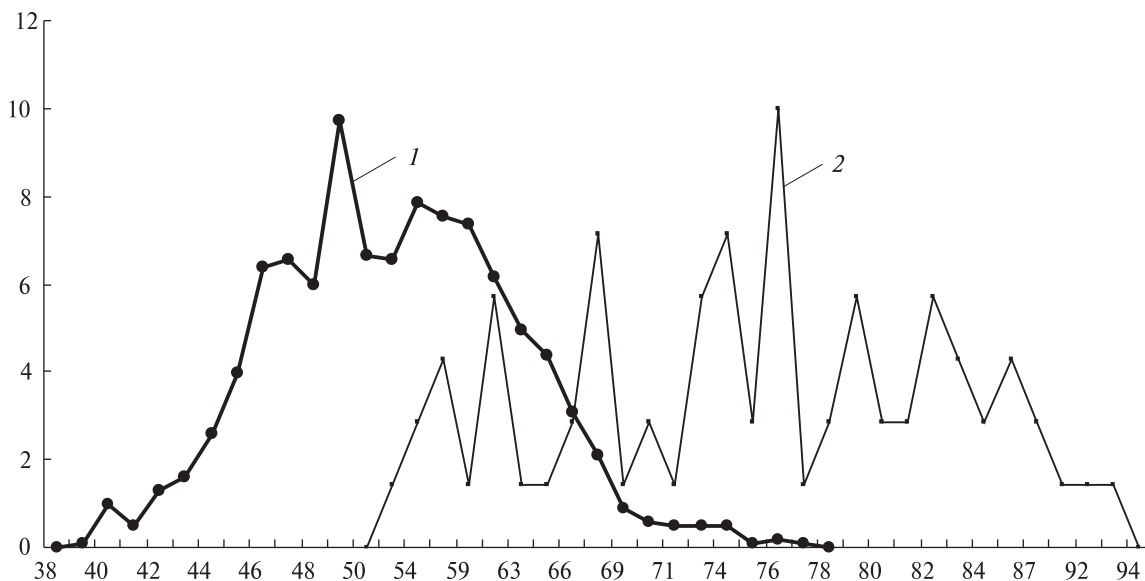


Рис. 2. Изменчивость числа жаберных тычинок у черноморско-азовской сельди *A. immaculata* ($n = 1006$) и пузанка *A. caspia* ($n = 70$) в бассейне Дуная: по вертикали – %; по горизонтали – число тычинок; 1 – *A. immaculata*; 2 – *A. caspia*. Материалы 2003–2007 гг.

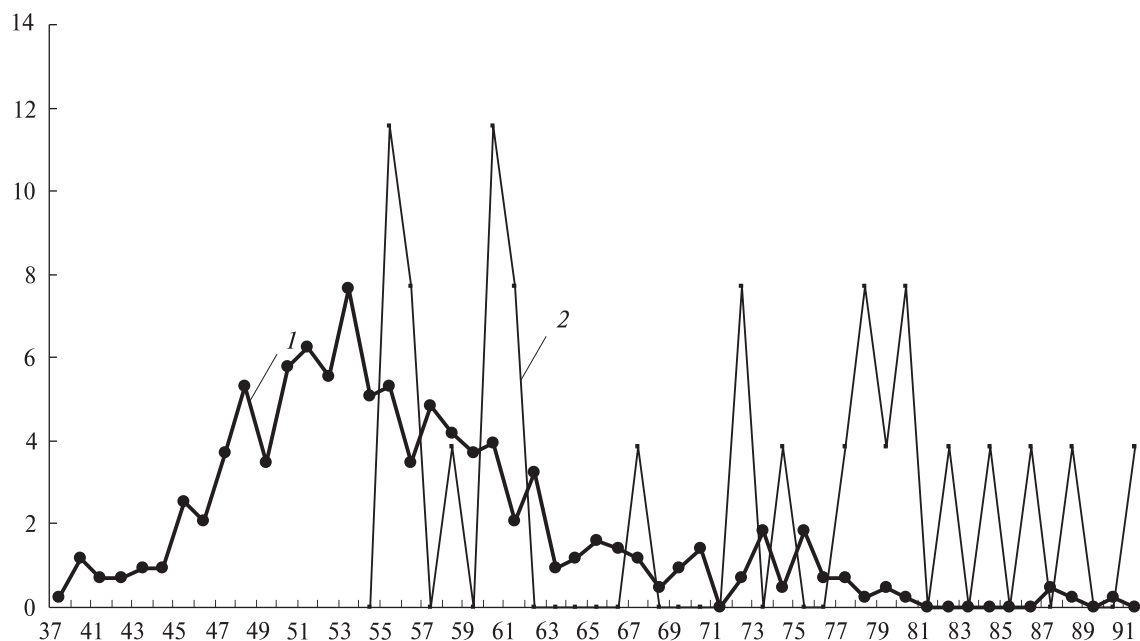


Рис. 3. Изменчивость числа жаберных тычинок пузанковых сельдей *Alosa* ssp. в бассейне Днепра: по вертикали – %; по горизонтали – число тычинок; 1 – 30-е гг. ($n = 432$) по [16]; 2 – 2005/07 гг. ($n = 26$). Особи с числом жаберных тычинок от 67 и выше отнесены к *A. caspia*

вокупной выборке близко к равномерному, поскольку представлено тремя группами, отличающимися по средним значениям жаберных тычинок. Подобного рода распределение отмечено для сельдей Керченского пролива и ра-

нее [12], а его необычная плосковершинная форма (рис. 4) и тогда объяснялась смешением в одной выборке *A. maeotica* и *A. immaculata*.

Таким образом, анализ изменчивости морфологических признаков доказывает, что

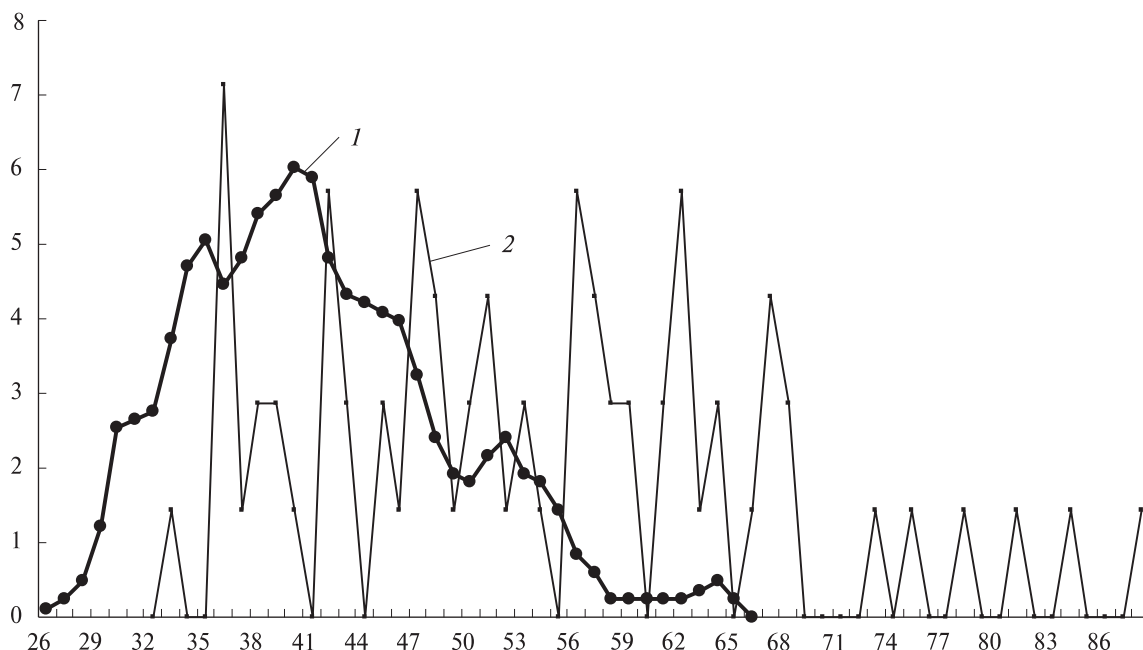


Рис. 4. Изменчивость числа жаберных тычинок у пузанковых сельдей *Alosa* ssp. в Керченском проливе: по вертикали – %; по горизонтали – число тычинок; 1 – ноябрь 1949 г. ($n = 821$) по [12]; 2 – декабрь 2007 г. ($n = 76$); *A. maeotica* – особи с числом жаберных тычинок от 39 и менее, *A. caspia* – от 68 и выше, остальные – *A. immaculata*

в проведенном исследовании представлены три вида пузанковых Азово-Черноморья. При этом отсутствие дифференциации между этими видами, причем не только на уровне фиксированных генных различий, но даже и в частотах аллелей полиморфных локусов, что в случае симпатрии могло быть свидетельством их репродуктивной изоляции, а также данные по изменчивости ДНК [7] дают основания для заключения о конспецифичности *A. immaculata* – *A. caspia* – *A. maeotica*. В результате вырисовывается достаточно обычная для анадромных рыб ситуация, когда один вид представлен несколькими экологическими формами, несомненно имеющими морфологическую дискретность, которая не зафиксирована на уровне генных различий. Похожая картина известна в Евразии у сигов между жилыми и проходными формами [17–19], когда проходные формы отличаются от жилых по размерам и имеют четкие отличительные морфологические признаки – те же жаберные тычинки. И в данной ситуации жилая форма – пузанок, постоянно обитающая в солоноватых лиманах и здесь же нерестящаяся, гораздо мельче про-

ходной черноморско-азовской сельди, нерестящейся в реке и на зиму мигрирующей в южную часть Черного моря. Что же касается керченской сельди, которая, как считается [13], подобно пузанку нерестится в лимане, но только называемом Азовским морем, то и это только экологическая форма, но отличающаяся не размерами, а числом жаберных тычинок. Следует подчеркнуть, что различия в числе жаберных тычинок, определенные для керченской и черноморско-азовской сельдей, в принципе укладываются в размах межсезонных изменений числа жаберных тычинок у той же средиземноморской финты [20, 21].

Несмотря на то, что запасы пузанковых в Азово-Черноморье подорваны в десятки раз [23], они все еще остаются промысловыми объектами, поэтому полученные результаты имеют важное практическое значение. Если считать, что пузанок и сельдь не разные виды, а только экоморфы, то это единая биологическая общность по большому счету одна и та же единица воспроизводства и эксплуатации. При этом особый практический интерес вызывает ситуация с каспийскими пузанковы-

ми, которых насчитывают не менее пяти видов [24], причем так же, как в Азово-Черноморье, они отвечают трем основным экологическим типам: проходные сельди, морские сельди и пузанки. В случае признания всего этого разнообразия единым видом, проявляющим значительную экологическую и морфологическую радиацию, то очевидно, что нужно менять представления об эксплуатации пузанковых и соответственно ревизовать правила рыболовства этих даже в Каспийском море исчезающих рыб.

Выводы. Таким образом, базируясь на полученных данных можно сделать вывод об очень высокой вероятности генетической идентичности трех традиционных видов черноморско-азовских пузанковых. Если же исходить из эволюционной концепции вида, представляющей вид как единицу эволюции [25, 26], что проявляется в фиксации альтернативных аллелей, то пузанка, сельдь черноморско-азовскую и керченскую следует считать одним видом.

S.V. Mezherin, L.V. Fedorenko, D.B. Verlatiy

GENETIC DIFFERENTIATION AND ALOZYME VARIATION OF SHADS OF GENUS *ALOSA* (*CLUPEIFORMES*, *ALOSIINAE*) FROM THE AZOV-BLACK SEA BASIN

Biochemical variation and differentiation of three species of Black-Azov sea shads (*Alosa immaculata*, *A. caspia*, *A. maotica*) from three local stocks of Danube, Dnepr and Azov sea has been estimated. The research was based on the analysis of variability of 19 enzymes and 5 structural muscle loci. As a result the high degree of monomorphism and absence of any differences in allele pools were proved that confirms the point of view about their species identity. Most likely that Caspian, Brazhnikov's and Pontic shads are only morphologically discrete forms which have unreasonably appropriated a rank of a species, actually, they are the inhabited and spawning migratory ecological morphs, almost always meeting at anadromous fishes.

С.В. Межжерин, Л.В. Федоренко, Д.Б. Верлатий

ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ І АЛОЗИМНА МІНЛИВІСТЬ ПУЗАНКОВИХ ОСЕЛЕДЦІВ РОДУ *ALOSA* (*CLUPEIFORMES*, *ALOSIINAE*) АЗОВО-ЧОРНОМОРСЬКОГО БАСЕЙНУ

Біохімічне генне маркування чорноморсько-азовських оселедців (*Alosa immaculata*, *A. caspia*, *A. maotica*) трьох локальних стад – дунайського, дніпровського і азовського – виконане на основі аналізу мінливості 19 ферментних локусів і серії локусів, що кодують

структурні білки м'язів. В результаті доведено високий ступінь мономорфізму і відсутність будь-яких відмінностей в аельних пулах, що підтверджує точку зору про їх конспецифічність. Імовірніше за все, що пузанок, бражниковий і прохідний оселедці – це тільки морфологічно дискретні форми, котрим безпідставно надали ранг видів. Насправді, це ні що інше, як жилі і прохідні екоморфи, що у більшості випадків зустрічаються у анадромних рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Межжерин С.В., Федоренко Л.В.* Генетическая изменчивость черноморской сельди *Alosa pontica* (Eichwald, 1838) (*Clupeiformes*, *Alosiinae*) популяции Дуная: анализ биохимических генных маркеров // Цитология и генетика. – 2005. – **39**, № 2. – С. 42–48.
2. *Межжерин С.В., Федоренко Л.В.* Генетическая структура нерестового стада дунайской сельди *Alosa pontica* Eichwaldt 1838 (*Clupeiformes*, *Alosiinae*) // Цитология и генетика. – 2005. – **39**, № 5. – С. 35–40.
3. *Boisneau P., Mennenson-Boisneau C., Guyomard R.* Electrophoretic identity between allies shad, *Alosa alosa* (L.), and twaite shad, *A. fallax* (Lacepede) // J. Fish Biol. – 1992. – **40**, № 5. – P. 731–738.
4. *Bentzen P., Legget W.C., Brown G.G.* Genetic relationships among the shads (*Alosa*) revealed by mitochondrial DNA analysis // J. Fish Biol. – 1993. – **43**, № 6. – P. 909–917.
5. *Alexandrine P.J., Ferrand N., Rocha J.* Genetic polymorphism of haemoglobin chain and adenosine deaminase in European shads: evidence for the existence of two distinct genetic entities with natural hybridization // J. Fish Biol. – 1996. – **48**, № 3. – P. 447–456.
6. *Alexandrino P., Faria R., Linhares D. et al.* Interspecific differentiation and intraspecific substructure in two closely related clupeids with extensive hybridization // J. Fish Biol. – 2006. – **69**, Suppl. B 3. – P. 242–259.
7. *Faria R., Weiss S., Alexandrino P.* A molecular phylogenetic perspective on the evolutionary history of *Alosa* sp. (*Clupeidae*) // Mol. Phyl. Evol. – 2006. – **40**, № 1. – P. 298–304.
8. *Bowen B.R., Kreiser B.R., Mickle P.F., Schaefer J.F., Adams S.B.* Phylogenetic relationships among North American *Alosa* species (*Clupeidae*) // J. Fish. Biol. – 2008. – **72**. – P. 1181–1201
9. *Межжерин С.В., Федоренко Л.В.* Генетические и морфологические доказательства таксономической неоднородности черноморско-азовской сельди (*Alosa pontica* (Eichwaldt, 1838) и пузанка (*A. caspia nordmanni* (Antipa, 1904)) Дуная // Доп. НАН України. – 2006. – № 6. – С. 160–165.
10. *Васильев В.П.* Эволюционная кариология рыб. – М.: Наука, 1984. – 299 с.
11. *Гинатулин А.А.* Структура, организация и эволюция генома позвоночных. – М.: Наука, 1984. – 294 с.

12. Маркевич О.П., Короткий І.І. Визначник прісноводних риб УРСР. — Київ : Рад. школа, 1954. — 208 с.
13. Павлов П.Й. Оселедцьові роду *Alosa* північно-західної частини Чорного моря. — К.: Вид-во АН УРСР, 1959. — 252 с.
14. Сиротенко М.Д. Черноморские сельди рода *Alosa* // Сырьевые ресурсы Черного моря. — М.: Пищ. пром-ть, 1979. — С. 233–242.
15. Владимиров В.И. Новая (приустьевая) форма днепровской сельди и некоторые вопросы систематики азовско-черноморской сельди // Зоол. журн. — 1961. — **11**, вып. 4. — С. 547–555.
16. Световидов А.Н. Рыбы Черного моря. — М.; Л.: Наука, 1964. — 552 с.
17. Амброз А.И. Рыбы Днепра, Южного Буга и Днепровско-Бугского лимана. — Киев : Изд-во АН УРСР, 1956. — 405 с.
18. Ferguson A., Himberg K.-J.M., Svårdson G. Systematics of the Irish pollan (*Coregonus pollan* Thompson): an electrophoretic comparison with other Holarctic Coregoninae // J. Fish Biol. — 1978. — **12**, № 3. — P. 221–233.
19. Hecht W., Förster M., Klein M. Biochemisch-genetische Untersuchungen zur Frage der genetischen Differenzierung von Blaufelchen (*Coregonus lavaretus wartmani*, Bloch) und Gangfisch (*Coregonus lavaretus macrophthalmus*, Nüsslein) aus dem Bodensee // J. Appl. Ichthyol. — 1987. — **3**, № 1. — P. 68–76.
20. Østbye K., Bernatchez T. F., Noesje K.J., Himberg M., Hindar K. Evolutionary history of the European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) species complex as inferred from mtDNA phylogeography and gill-raker numbers // Mol. Ecol. — 2005. — **14**, № 14. — P. 4371–4387.
21. Coree M., Alexandrino P., Sabatie M.R., Aprahamian M.W., Bagliniere J.L. Genetic characterisation of the Rhodanian twaite shad, *Alosa fallax rhodanensis* // Fish. Manag. and Ecol. — 2005. — **12**. — P. 275–282.
22. Bianco P.G. The Status of Twaite Shad, *Alosa agone*, in Italy and Western Balkans // Marine Ecol. — 2002. — Suppl. 1. — P. 51–64.
23. Межжерин С.В., Федоренко Л.В. О возможной депрессии дунайского стада черноморско-азовской сельди *Alosa pontica* (Eichwald, 1838) // Доп. НАН України. — 2005. — № 2. — С. 160–166.
24. Световидов А.Н. Сельдевые (*Clupeidae*) // Фауна СССР. Т. 2. Рыбы. — М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1952. — 331 с.
25. Cracraft J. Species concepts and speciation analysis // Cur. Ornithol. — New York : Plenum press, 1983. — **1**. — P. 159–187.
26. McKittrick M.C., Zink R.M. Species concepts in ornithology // Condor. — 1987. — **90**. — P. 1–14.

Поступила 02.04.08