

- Милиус А.Ю., Линдперс А.В., Стараст Х.А. 1987. Статистическая модель трофического состояния малых светловодных озер // Водные ресурсы. № 3. С. 63–66.
- Морозов А.К. 1998. Химический состав воды // Современное состояние водных объектов РК. Петрозаводск. КарНЦ РАН. С.161–162.
- Нарчук Э.П. 1999. Определитель беспозвоночных России и сопредельных территорий. С -Пб. С. 210–296.
- Панкратова В.Я. 1983. Личинки и куколки комаров подсемейства Chironominae фауны СССР. Л.: Наука. 295с.
- Правдин И.Ф. 1966. Руководство по изучению рыб М.: Наука. 376с.
- Федоров В.Д. 1979. О методах изучения фитопланктона и его активности.- М.: Изд-во МГУ. 176с.
- Хендерсон-Селлерс Б., Маркленд Х. 1990. Умирающие озера. (Причины и контроль антропогенного эвтрофирования). Л.: Гидрометеиздат. 279 с.

ВНУТРИВИДОВАЯ СТРУКТУРА ЧЕРНОМОРСКО – КАСПИЙСКОЙ ТЮЛЬКИ *CLUPEONELLA CULTRIVENTRIS* (NORDMANN, 1840) ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АЛЛОЗИМНОЙ И RAPD- ИЗМЕНЧИВОСТИ

В.В. Столбунова, Д.П. Карабанов

Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод
им. И.Д.Папанина РАН, Борок, Ярославская обл., Россия
e-mail: vvsto@mail.ru

Вопрос о таксономическом статусе и степени внутривидовой подразделенности черноморско – каспийской тюльки до настоящего времени остается дискуссионным. У черноморско-каспийской тюльки *Clupeonella cultriventris* (ранее – *C. delicatula*) в связи с большим географическим ареалом выделяли 4 подвида: черноморская тюлька *C. delicatula delicatula*, каспийская тюлька *C. delicatula caspia*, азовская тюлька *C. delicatula azovi* и чархальская тюлька *C. delicatula tscharchalensis* (Владимиров, 1950; Световидов, 1952). По данным традиционного морфологического анализа азово-черноморские и каспийские популяции неоднократно переписывались то в статусе единого вида, то в статусе двух подвигов (Световидов, 1964; Атлас, 2002; Богущкая, Насека, 2004). После создания водохранилищ почти на всем протяжении Волги тюлька за короткий исторический период (порядка 40–50 лет) самостоятельно расселилась по всем водохранилищам каскада, а также по водохранилищам р. Камы и р. Шексна. При этом, фактически с момента первого обнаружения тюльки в волжских водохранилищах, встал вопрос об источнике ее происхождения – из азово-донской или же из каспийской популяции.

Для определения степени внутривидовой подразделенности и уточнения таксономического статуса тюльки в бассейнах Черного, Азовского и Каспийского морей был осуществлен популяционно-генетический анализ ряда крупных групп популяций с применением методов диск-электрофореза белков в полиакриламидном геле (PAGE) и полимеразной цепной реакции со случайными праймерами (RAPD-PCR).

RAPD – маркеры локализованы в основном в некодирующей области ДНК, скорость мутирования ее вдвое выше, чем в кодирующей области, которая составляет всего 1% генома, показателем полиморфизма которой является аллозимная изменчивость. Используемые методы дополняют друг друга и позволяют исследовать геном в целом.

Для анализа аллозимной изменчивости использовали выборки в размере 40 экземпляров из популяций: Сев. Каспия, 2 – Волгоградского вдхр., 3 – Горьковского вдхр., Рыбинского вдхр., Азовского м., Днестровского лим., р. Днепр, р. Маныч, *C. engrauliformes* (Каспийского м.). Живую рыбу фиксировали жидким азотом в сосудах Дьюара СК-50, либо замораживали при температуре не выше –27°C. В лабораторных условиях отбирали образцы для генетического исследования. Разделение и гистохимическое выявление аллозимов проводилось в соответствии со стандартными методиками (Глазко, 1988; Walker, 2002). В качестве основных изучаемых ферментов использовались: α-глицерофосфат дегидрогеназа (Е.С. 1.1.1.8), лактатдегидрогеназа (Е.С. 1.1.1.27), малатдегидрогеназа NAD-зависимая (Е.С. 1.1.1.37), малатдегидрогеназа NADP-зависимая (Е.С. 1.1.1.40), 6-фосфоглюконат дегидрогеназа (Е.С. 1.1.1.44), глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (Е.С. 1.1.1.49), супероксиддисмутаза (Е.С. 1.15.1.1),

аспартатаминотрансфераза (Е.С. 2.6.1.1); щелочная фосфатаза (Е.С. 3.1.3.1), эстеразы эфиров карбоновых кислот: 2-нафтилацетат зависимая эстераза и D-эстераза (Е.С. 3.1.1.x) и спектр общего белка (GP, μlog). При разделении ферментов применялись вертикальные электрофоретические камеры с пластинами PAG, при этом одновременно исследовалось 40 образцов в блоке.

RAPD-изменчивость изучали в выборках тюльки из популяций Северного Каспия (приустьевой участок р.Сулак), Пролетарского водохранилища р. Маныч, Азовского моря (у п.Чумбур – Коса) и Рыбинского водохранилища р. Волга. Исследовано 4 выборки по 10 особей в каждой. Выделение тотальной ДНК проводили из мышечной ткани с помощью набора реагентов Diatom DNA Prep 100. Для выявления геномной вариабильности использовали семь случайных праймеров следующего состава: OPA11, OPA17; OPA19; R55; P29; OPA20; SB2. ПЦР проводили на амплификаторе TP4-ПЦР-01 (ДНК-Технология). Программа амплификации включала в себя этап первоначальной денатурации ДНК – 5 мин., +94°C; затем 35 циклов синтеза фрагментов ДНК : денатурация -94°C в течение 2 мин, отжиг – 45°C – 1 мин, элонгация – 72°C – 2 мин. После завершения программы температура снижалась до 4°C. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводилось в 1,5% агарозном геле толщиной 7 мм, в течение 8 часов. Агарозные гели, окрашенные бромистым этидием, просматривали в УФ с длиной волны $\lambda=312$ нм и фотографировали цифровой камерой фирмы Olympus C-2100 Ultra Zoom. Изображения заносили в компьютерную базу данных. В качестве маркеров молекулярной массы использовали 100 bp, 50 bp и 1kb Ladder (Fermentas). Денситометрический анализ активности изоферментов проводили по индивидуальным электрофоретическим трекам с использованием пакета RFLPscan Plus v.3.12 (CSP, Inc.). Популяционно-генетический анализ проводился с использованием программы BIOSYS r.1.7 и TREECON (Van der Peer, 1994). Статистический анализ и графическое представление материалов проводилось в программе STATISTICA v.7 (StatSoft, Inc.). Для определения таксономического статуса была проведена UPGMA-кластеризация крупных групп популяций тюльки из разных бассейнов на основании дистанций Нэя (Nei, 1972), с использованием в качестве репера данных по каспийской популяции анчоусовидной тюльки *C. engrauliformes*.

Результаты по аллозимной изменчивости свидетельствуют, что на всем протяжении своего современного ареала черноморско-каспийская тюлька представляет собой генетически единую совокупность популяций *Clupeonella cultriventris* in sensu lato, надежно дифференцированную от родственного вида – анчоусовидной тюльки (рис. 1). Значимых генетических различий межвидового уровня (по классификации Ayala, 1975) между азово-черноморской, каспийской и маньчской тюлькой не наблюдается (дистанция 0,036), тогда как между черноморско-каспийской и анчоусовидной тюлькой различия достигают величины генетической дистанции 0,69, что может характеризовать их как надежные таксономические виды.

С помощью семи случайных праймеров было выявлено 148 локусов, из них 20 – видоспецифичных мономорфных локуса, общих для четырех популяций. Уровень полиморфизма составил 85.0%. Внутри каждой из четырех выборок доля полиморфных локусов составила: 74.0% (Азовское море), 69.0% (Северный Каспий), 70.0% (р.Маныч), 68.0% (Рыбинское в-ще). При анализе установлено, что выборка из района Северного Каспия наиболее гетерогенна и достоверно отличается ($p < 0,05$) от других популяций по среднему числу RAPD-фрагментов ($70,6 \pm 2,3$), тогда как выборки из р. Маныч, Азовского моря и р. Волга не различаются между собой по этому показателю ($60,0 \pm 1,4$; $61,6 \pm 2,6$; $61,5 \pm 2,3$, соответственно). По данным RAPD- анализа отмечено совпадение мономорфных видоспецифичных RAPD-фрагментов у представителей всех выборок, что говорит о значительном сходстве геномов исследуемых особей. При исследовании генетических расстояний (рис.2.), несмотря на столь отчетливую кластеризацию, индекс бутстрепа даже по основным кластерам свидетельствует о слабой надежности объединений (32–35%), что также свидетельствует о таксономическом видовом единстве тюльки этих популяций и что внутривидовая дивергенция тюльки двух рассматриваемых морских бассейнов, по всей видимости, не достигает даже статуса подвидов. Не исключено, что формирование этих субкластеров вызвано обитанием тюльки в водоёмах с различной степенью минерализации. Отсутствие различий пресноводных популяций Днепра в сравнении с лиманными черноморскими популяциями, вероятно, может быть объяснено исторической молодостью этих пресноводных групп, в которых изменения частот аллелей ещё не достигли существенных значений. С другой стороны, последовательность формирования внутривидовых кластеров и их четкая географическая детерминированность позволяет с уверенностью говорить, во-первых, о более ранней в палеонтологическом масштабе времени дивергенции азовских и каспийских популяций, а во-вторых, о несомненном происхождении волжских и маньчских популяций из каспийских.

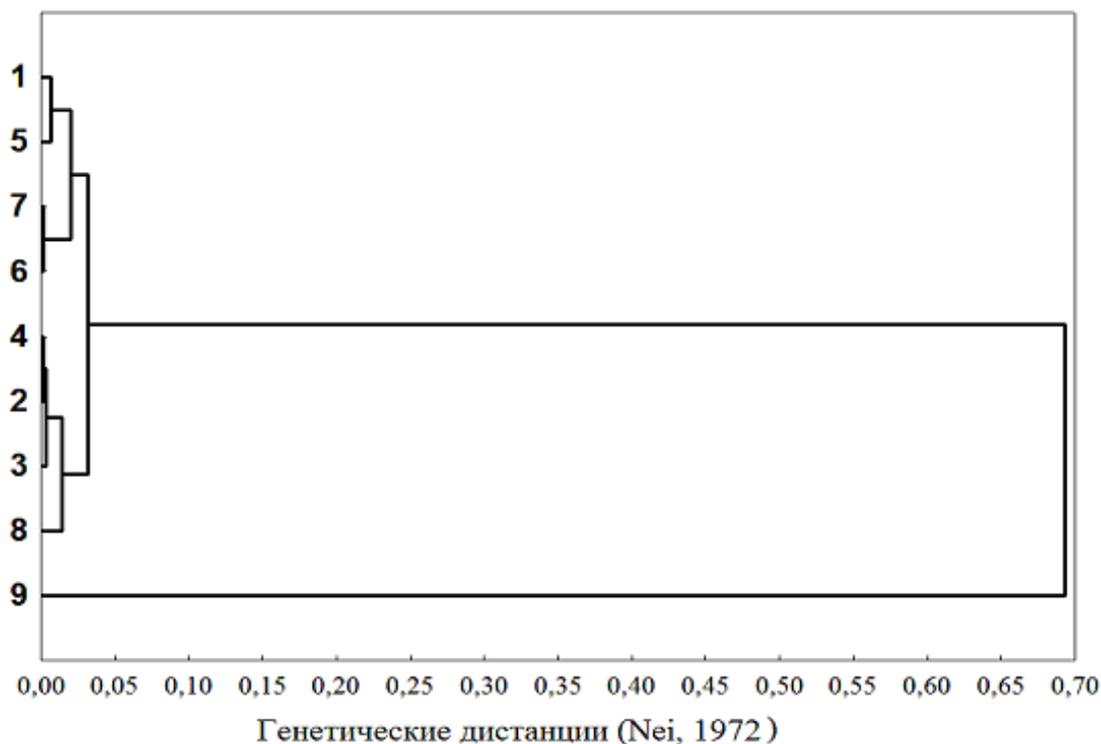


Рис.1. Иерархическая структура основных географических групп популяций *C. cultriventris* с реперным видом *C. engrauliformes* на основании популяционно-генетического анализа 12 локусов. Результат иерархической кластеризации (UPGMA) на основании генетических дистанций Нэя (Nei, 1972, 1975). Популяции: 1- Сев. Каспий, 2- Волгоградское вдхр., 3- Горьковское вдхр., 4- Рыбинское вдхр., 5- Азовское м., 6- Днестровский лим., 7- р. Днепр, 8- Маныч, 9- *C. engrauliformes* (Каспийское м.).

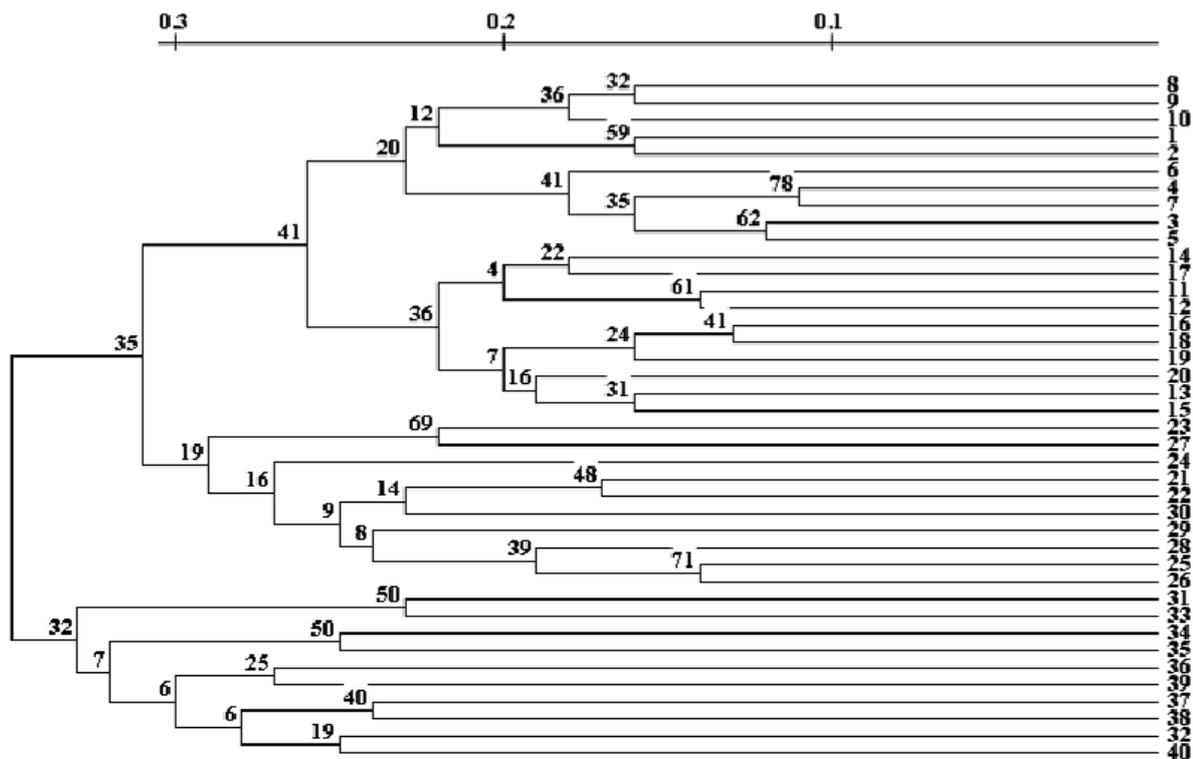


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства между популяциями различных частей ареала *C. cultriventris*. Результат иерархической кластеризации (UPGMA) на основании генетических дистанций Нэя (Nei, 1978), в узлах ветвления указан индекс бутстрепа. Популяции: р. Маныч, Пролетарское вдхр. (особи 1–10); р. Волга, Рыбинское вдхр. (11–20); Сев. Каспий, р.н- устья р. Сулак (21–30); Азовское м., Чумбур-Коса (31–40).

Впервые генетическими методами показано, что черноморско-каспийская тюлька является генетически единым таксономически валидным видом. Выделение независимых таксонов внутри вида *Clupeonella cultriventris sensu lato* не подтверждается генетическими исследованиями. На внутривидовом уровне тюлька подразделяется на две популяционные группы – Черноморско-Днепровско-Азово-Каспийскую и Волго-Манычскую.

Литература

- Аннотированный каталог круглоротых и рыб континентальных вод России. Ред. Решетников Ю.С. М.: Наука, 1998. 220 с.
- Богущая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М.: КМК, 2004. 389 с.
- Владимиров В.И. О систематическом положении азовской и черноморской тюльки *Clupeonella delicatula* (Nordmann) // ДАН СССР. 1950. Т.70. №1. С. 125–128.
- Глазко В.И. Генетика изоферментов сельскохозяйственных животных. Итоги науки и техн. ВИНТИ, 1988. Сер. Общ. генетика. – 212 с.
- Световидов А.Н. Сельдёвые (Clupeidae). Фауна СССР. Рыбы. Т.2. Вып.1. М.–Л.: Изд. АН СССР, 1952. 333с.
- Van der Peer Y., De Wachter. R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for Microsoft Windows environment// Comput. Applic. Biosci. 1994. V. 10. P.569–570.

INTRASPECIFIC STRUCTURE BLACK SEA AND CASPIAN KILKA (*CLUPEONELLA CULTRIVENTRIS*) OF THE (NORDMANN, 1840) BY RESULTS OF ALLOZYME AND RAPD-VARIABILITY

V.V. Stolbunova, D.P. Karabanov

Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Yaroslavl Reg., Russia
e-mail: vvsto@mail.ru

For definition of a degree intraspecific differentiation and specifications the taxonomical status kilka in pools of the Black, Azov and Caspian seas have been carried out the population-genetic analysis of some large groups of populations with application of methods a disk – electrophoresis of protein in polyacrylamide gel (PAGE) and polymerase chain reaction with random markers (RAPD-PCR). Data obtained both on izopherment composition & RAPD-markers allow to suppose that Caspian Sea and Azov-Black Sea basin kilka is differentiated on the population level and doesn't reach taxonomical status of subspecies

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ЭСТУАРНЫХ БЕНТОСНЫХ СООБЩЕСТВ БЕЛОГО МОРЯ (НА ПРИМЕРЕ ЛАПШАГИНСКОГО И ЧЕРНОРЕЧЕНСКОГО ЭСТУАРИЕВ)

А.П. Столяров

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
биологический факультет, г. Москва, Россия
e-mail: macrobenthos@mail.ru

В эстуарных экосистемах наблюдаются два основных градиента факторов среды: продольный (вдоль эстуария – от мористой части эстуария в сторону реки) и вертикальный (от верхней литорали к нижней и sublиторали), формирующие соответствующие направленные изменения видовой структуры сообщества. Продольный градиент обусловлен в первую очередь изменениями солёности воды и связанными с ней гидрологическими факторами (скорость водообмена между морскими и пресными водами, рельеф дна и т.д.) (Сафьянов, 1987; Столяров и др., 2002; Shiqiang et al., 2001). Вертикальный градиент определяется главным образом временем осушения литорали, т.е. приливно-отливными явлениями (Голиков, Бабков, 1985; Evans, 1957). С продолжительностью осушения тесно связаны колебания температуры, влажности, солёности воды, окислительно-восстановительный потенциал (Бурковский, 1992).