

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИИ ЕВРОПЕЙСКОГО АНЧОУСА *ENGRAULIS ENCRASICOLUS* В АЗОВО-ЧЕРНОМОРСКОМ БАССЕЙНЕ

Н. А. Небесихина, Е. В. Лебедева

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ «ВНИРО»),  
Азово-Черноморский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («АзНИИРХ»), Ростов-на-Дону  
E-mail: nebesihina\_n\_a@azniirkh.ru

**Аннотация.** С помощью STR-локусов изучено генетическое разнообразие 11 выборок европейского анчоуса из бассейна Азовского и Черного морей. Анализ микросателлитной изменчивости выявил высокую внутривидовую изменчивость (96 %). Уровень межпопуляционной дифференциации в среднем по всем локусам составил  $F_{st}=0,02$ . Высокий уровень изменчивости европейского анчоуса позволяет формировать единое стадо, приспособленное к изменяющимся условиям обитания. Миграционная активность вида обеспечивает высокий уровень потока генов между отдельными нерестовыми популяциями ( $N_m=22,5$  %). Фенотипическая подразделенность европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне носит явно эпигенетический характер.

**Ключевые слова:** европейский анчоус *Engraulis encrasicolus*, отолиты, микросателлитные локусы (STR), генетическая структура

## STUDY OF THE GENETIC STRUCTURE OF THE EUROPEAN ANCHOVY *ENGRAULIS ENCRASICOLUS* POPULATION IN THE AZOV AND BLACK SEA BASIN

N. A. Nebesikhina, E. V. Lebedev

Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI "VNIRO"),  
Azov-Black Sea Branch of the FSBSI "VNIRO" ("AzNIIRKH"), Rostov-on-Don  
E-mail: nebesihina\_n\_a@azniirkh.ru

**Abstract.** Genetic diversity of 11 samples of the European anchovy from the Azov and Black Sea Basin has been studied. Analysis of the microsatellite variability has shown high intrapopulation variance (96 %). The level of inter-population differentiation by all loci was  $F_{st}=0.02$  on average. High level of the European anchovy variability allows for development of a single stock, which easily adapts to changing environment. Migratory activity of this species ensures a high rate of gene flow among individual spawning populations ( $N_m=22.5$  %). Phenotypic distinction of the European anchovy in the Azov and Black Sea Basin is, evidently, epigenetic.

**Keywords:** European anchovy *Engraulis encrasicolus*, otoliths, microsatellite loci (STR), genetic structure

### ВВЕДЕНИЕ

В Азово-Черноморском бассейне европейский анчоус (хамса) представляет собой один из наиболее массовых видов рыб, а также является важным объектом промысла. На основе морфобиологических и физиологических критериев хамсу подразделяют на две расы: черноморскую и азовскую. Изъятие хамсы промыслом осуществляется на основе оценки численности двух запасов. Для рационального использования промысловых запасов хамсы в Азово-Черноморском бассейне необходимо изучение популяцион-

но-генетической структуры вида. Анализ генетической изменчивости митохондриальной ДНК (Cytb) не выявил генетической дифференциации у азово-черноморской хамсы [1].

Использование полиморфных микросателлитных маркеров позволит дать оценку популяционной структуре и выявить современный уровень генных потоков между популяциями.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили 5 выборок европейского анчоуса, отобранные в нерестовый период 2013–2018 гг. в Азовском и Черном морях. В исследование также вошли 6 выборок азово-черноморской хамсы, отобранные в зимовально-промысловых скоплениях в период 2014–2019 гг. в территориальных водах России и Республики Абхазия (табл. 1). Районы отбора проб указаны на рисунке.

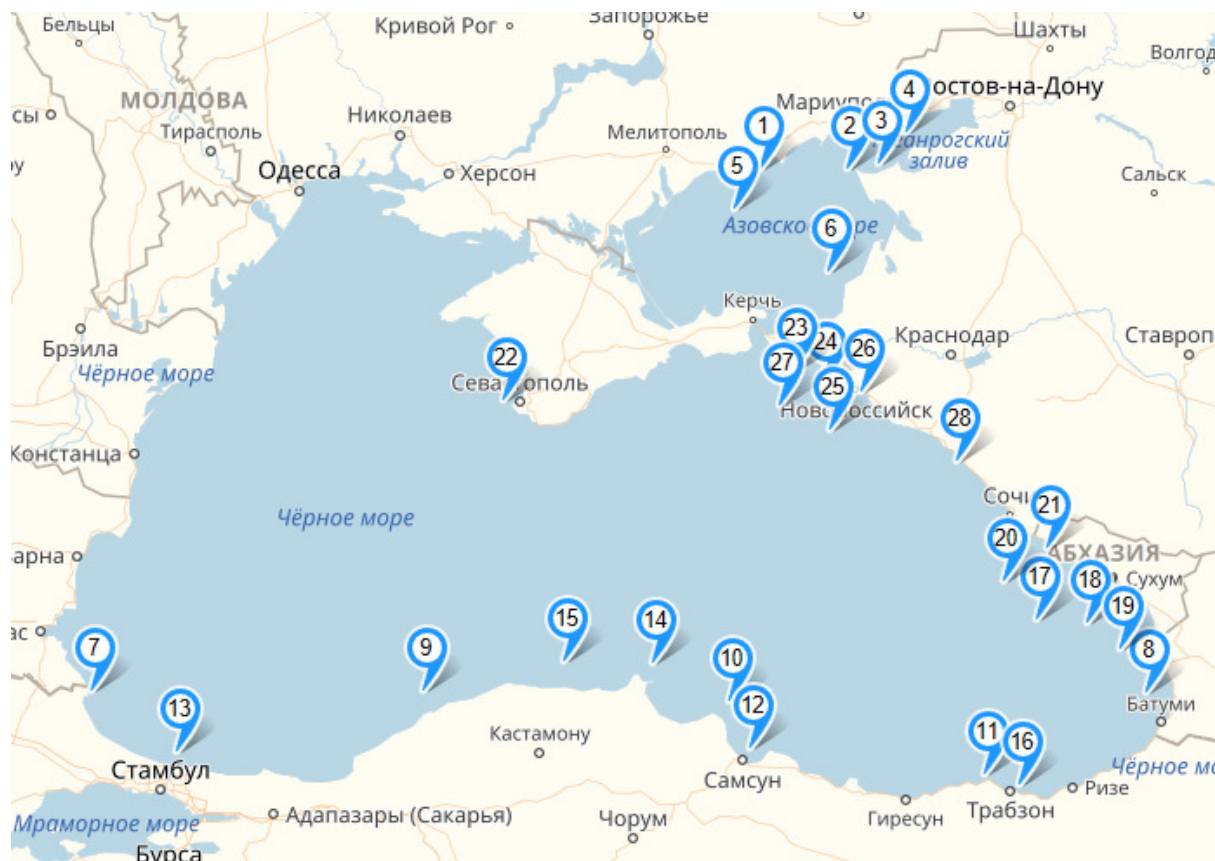
**Таблица 1.** Характеристика анализируемого материала

Бассейн	Условное обозначение выборки	Место отбора	Дата отбора	Кол-во особей	Рыбы, имеющие морфотип, %	
					Азов.	Черн.
Азовское море	Azov-13	Бердянский залив	июнь 2013	30	61	39
	Azov-16	Должанская, Воронцовка	август 2016	37	69	31
	Azov-18	Таганрогский залив,	июнь 2018	90	67	33
Черное море	Turkey-15	Ингеада, Анаклия, Бартын, Бафра, Чаршибаши, Самсун	сентябрь 2015	75	23	77
	Turkey-18	Стамбул, Синоп, Абана, Трабзон	июль 2018	73	16	84
	Abkhazia-14	Сухум	февраль 2014	40	–	–
	Abkhazia-18	Скурча, Очамчира, Пицунда, Гагра	январь 2018	74	64	36
	Crimea-15	Севастополь	декабрь 2015	50	68	32
	Caucasian-16	Анапа, Супсех, Варваровка	ноябрь 2016	30	56	44
	Caucasian-18	Новороссийск	декабрь 2017	64	84	16
	Caucasian-19	Анапа, Туапсе	январь 2019	90	51	49

Данные образцы прошли регистрацию в генетической базе «Каталог коллекции тканей хамсы (европейского анчоуса) (*Engraulis encrasicolus*) для молекулярно-генетического анализа» (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2015621737 от 07.12.2015). Образцы соматических тканей хранятся в 95%-ном этаноле при минус 30 °С.

Выделение ДНК проводили солевым [2] и колоночным методами [3] из фрагментов плавников.

STR-генотипирование проводили по 9 микросателлитным локусам (Ee2-508, Ee2-135, Ee2-483b, Ee2-91b, Ee2-407, Ee2-477, Ee2-91a, Ee2-165, Ee2-507), ранее использованным в анализе европейского анчоуса средиземноморской и атлантической популяций [4]. В табл. 2 указаны основные характеристики используемых STR-локусов.



Карта-схема районов отбора проб: 1 — Азовское море, 2013; 2–3 — Азовское море, лето 2016; 4–6 — Азовское море, лето 2018; 7–12 — Турция, лето 2015; 13–16 — Турция, лето 2018; 17 — Абхазия, зима 2014; 18–21 — Абхазия, зима 2018; 22 — Крым, зима 2015; 23–25 — Кавказ, зима 2016; 26 — Кавказ, зима 2018; 27–28 — Кавказ, зима 2019

**Таблица 2.** Характеристика микросателлитных локусов, использованных для генотипирования хамсы

Локус	Последовательность праймеров	Метка	Мотив	Размерный диапазон, пн	№ генбанка
Ee2-91a	F: AGAGCAGGTTCTTGCTGTGG R: TGTGGTGCCTACTATCAGG	(R6G)	(AGG) <sub>12</sub>	117–184	FJ534732
Ee2-91b	F: GGTCTTGAGCTTGGCATAGG R: CCGGAAGACACTCTGCACAC	(FAM)	(CCGCA) <sub>8</sub>	105–150	FJ534732
Ee2-135	F: AGGGCAGTGACAGGAGAGTC R: TCGTTACCCTGCGTTTATACTG	(R6G)	(ATTAG) <sub>10</sub>	212–316	FJ534738
Ee2-165b	F: GGGTGGGTTAAAGATGAAGC R: AGGGATCTTCAGGGAACCAAG	(FAM)	(CCT) <sub>7</sub>	257–281	FJ534742
Ee2-407	F: AGGAATCTCCTTCCCGTCTC R: GTGGGTCTGTGGGTGTTTTG	(R6G)	(CA) <sub>13</sub>	152–223	FJ534751
Ee2-507	F: GGAAGGGACCTAGATGGAGTG R: ATCCATTGATGTCCTGAGC	(FAM)	(GAAA) <sub>14</sub> GAAC (GAAA) <sub>6</sub> GAGA (GAAA) <sub>4</sub>	244–384	FJ534758
Ee2-477	F: TTGGTGAGGAAGCAACAGTG R: TAAGATGGCACGCTGACTTG	(TAMRA)	(AGG) <sub>7</sub>	117–230	FJ534755
Ee2-483b	F: ATGAGAAGGAGGACGGTGTG R: AATGGGATAGCTCGTTGTGC	(TAMRA)	(AGG) <sub>11</sub>	206–236	FJ534757
Ee2-508	F: CACATGCTCGCTAAACATTG R: ACCTGATGCTGCTTGGTAGC	(FAM)	(AGG) <sub>8</sub>	182–195	FJ534759

Локусы были объединены в три мультиплексные ПЦР реакции, для увеличения специфичности и чувствительности были использованы модификации в части концентрации праймеров [5] и режима амплификации [6]. Каждую ПЦР выполняли в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 50–100 нг ДНК; по 1 пкМ меченых флуоресцентным красителем прямых праймеров, по 15 пкМ обратных (немеченых) праймеров; 1х буфер (Синтол); 1,8 mM MgCl<sub>2</sub> (Синтол); 0,8 единиц Taq-полимеразы («Силекс») и 0,2 mM dNTP. Режим амплификации содержал следующие этапы: предварительная денатурация ДНК — 1 мин при 94 °С; 8 циклов: плавление — 20 с при 95 °С, отжиг праймеров — 25 с при 58 °С в первом цикле со снижением в каждом последующем цикле на 0,5 °С, синтез ДНК — 40 с при 65 °С; 25 циклов: плавление — 20 с при 95 °С, отжиг праймеров — 25 с при 54 °С, синтез ДНК — 40 с при 65 °С; цикл досинтеза ДНК — 10 мин при 65 °С.

Продукты амплификации разделяли с помощью капиллярного электрофореза на устройстве секвенирования ДНК «Нанофор-05» (ЭЗАН, Россия), используя размерный стандарт СД-450(LIZ) (Компания «Синтол»). Полученные первичные данные обрабатывали с помощью программы «ДНК ФА» (Компания «Синтол»).

Используя GenAlEx v.6 для каждой выборки подсчитывали среднее число аллелей на локус (A), число эффективных аллелей (AR), наблюдаемую (Ho) и ожидаемую (He) гетерозиготность, Fis — коэффициент инбридинга, для объединенных данных выполняли анализ PCA, расчет параметров генетического разнообразия и дифференциации, иерархический анализ молекулярной дисперсии (AMOVA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У 659 особей хамсы из 11 выборок было выявлено 172 аллеля. Наиболее изменчивым оказался локус Ee2-507 с максимальным количеством аллелей (39), наименее изменчивым локус — Ee2-165b с 7 аллельными вариантами (табл. 3). Эффективное число аллелей на локус варьировало от 2,6 до 16,2. Все маркеры продемонстрировали высокий уровень ожидаемой гетерозиготности от 0,698 до 0,937. По всем локусам были зафиксированы значимые отклонения от равновесия Харди-Вайнберга, что нередко отмечается для данного вида в других популяциях [7]. Частоты нулевых аллелей, превышающие пороговое значения ( $r \geq 0,20$ ) [8], выявлены в локусах Ee2-508, Ee2-483b и Ee2-165.

Средние значения наблюдаемой ( $Ho=0,553 \pm 0,02$ ) и ожидаемой ( $He=0,785 \pm 0,01$ ) гетерозиготности хамсы оказались на уровне соответствующих показателей для европейского анчоуса других популяций: Бискайского залива [9], Адриатического, Черного и Средиземного морей [9].

Рассчитанные оценки Fis >0 и Fit >0 указывают на дефицит гетерозигот как исследуемых в выборках, так и во всей совокупности. Наибольшая степень генетической дифференциации между анализируемы-

**Таблица 3.** Генетические характеристики микросателлитных локусов

Локус	N	N <sub>A</sub>	AR±se	Mean Ho	Mean He	Fis	HWE	Null
Ee2-508	651	18	3,8±0,5	0,282	0,698	0,596	***	<b>0,289</b>
Ee2-135	655	13	6,2±0,2	0,744	0,838	0,112	***	0,081
Ee2-483b	648	13	5,0±0,3	0,510	0,793	0,356	***	<b>0,238</b>
Ee2-91b	646	10	5,3±0,4	0,641	0,803	0,202	***	0,039
Ee2-407	655	34	5,4±0,2	0,643	0,810	0,207	***	0,106
Ee2-477	646	21	4,6±0,3	0,598	0,774	0,227	***	0,138
Ee2-165	658	7	2,6±0,1	0,532	0,614	0,134	***	0,045
Ee2-91a	644	17	5,1±0,3	0,323	0,794	0,594	***	<b>0,393</b>
Ee2-507	649	39	16,2±0,7	0,703	0,937	0,250	***	0,127
Среднее				0,553±0,02	0,785±0,01			

Примечание: N — количество особей; N<sub>A</sub> — количество аллелей; AR — эффективное число аллелей; Mean Ho — средняя наблюдаемая гетерозиготность; He — средняя ожидаемая гетерозиготность; Fis — коэффициент инбридинга; Null — частота нуль-аллелей; HWE — равновесие Харди-Вайнберга; уровень достоверности: \*\*\* P < 0,001

ми выборками отмечена для локуса Ee2-407 ( $F_{st}=0,0955$ ), а наименьший вклад внес локус Ee2-165 ( $F_{st}=-0,0019$ ). По оценкам  $R_{st}$ , выборки наиболее гетерогенны по локусу Ee2-508, в то же время высокополиморфный локус Ee2-507 вносит незначительный вклад в дифференциацию выборок (табл. 4).

**Таблица 4.** Значение аллельных частот полной выборки

Локус	Fis	Fst	Fit	Ris	Rst	Rit
Ee2-508	0,6079	0,0389	0,6231	0,7363	0,0979	0,7621
Ee2-135	0,1092	0,0107	0,1187	0,1652	0,0111	0,1744
Ee2-483b	0,3897	0,0257	0,4054	0,3658	0,0053	0,3692
Ee2-91b	0,2226	0,0096	0,2300	0,3581	0,0186	0,3701
Ee2-407	0,2546	0,0955	0,3257	0,2605	0,0074	0,2659
Ee2-477	0,2437	0,0190	0,2580	0,1304	0,0350	0,1608
Ee2-165	0,1339	-0,0019	0,1322	0,2193	-0,0011	0,2185
Ee2-91a	0,6246	0,0201	0,6322	0,8727	0,0142	0,8745
Ee2-507	0,2638	0,0076	0,2694	0,3012	0,0085	0,3071
По всем локусам	0,3151	0,0261	0,3330	0,0247	0,0247	0,2614

Для определения генетической подразделенности исследуемых выборок по частотам аллелей были рассчитаны генетические дистанции Нея [10] и значения  $F_{st}$ . Уровень попарной межвыборочной дифференциации в величинах  $F_{st}$  варьировал в пределах 0,005–0,032, согласно D.L. Hartl и A.G. Clark [11], значения  $F_{st} < 0,05$  свидетельствуют о незначительной генетической дифференциации. Оценки попарных генетических дистанций Nei GD находились в диапазоне от 0,048 до 0,296. Полученные значения  $F_{st}$  и Nei GD указывают на незначительную внутрипопуляционную дифференциацию (табл. 5).

Данный уровень значений дифференциации является незначительным, что подтверждается данными анализа AMOVA, где уровень межпопуляционных различий составляет всего 4 %, а внутрипопуляционной — 96 %.

Рассчитанное значение процента мигрантов на одно поколение ( $Nm=22,5$  %) показывает, что между азовской и черноморской хамсой идет активный генетический обмен, что согласуется с данными по морфологии отолитов. Так, в выборке хамсы в Черном море (у берегов Турции) отмечено 19,9 % рыб, имеющих азовский морфотип, а в Азовском море — 32,7 % рыб с черноморским морфотипом. Анализ

**Таблица 5.** Значения в выборках хамсы попарных величин  $F_{st}$  — над диагональю, генетических дистанций Нея (Nei GD) — под диагональю

Azov-13	Azov-16	Azov-18	Turkey-15	Turkey-18	Abkhazia-14	Abkhazia-18	Crimea-15	Caucasian-16	Caucasian-18	Caucasian-19	
	0,025	0,016	0,023	0,016	0,012	0,013	0,025	0,024	0,013	0,013	Azov-13
0,227		0,025	0,006	0,029	0,032	0,024	0,006	0,007	0,023	0,027	Azov-16
0,129	0,252		0,025	0,006	0,009	0,008	0,022	0,027	0,005	0,008	Azov-18
0,209	0,051	0,245		0,028	0,033	0,022	0,006	0,009	0,024	0,022	Turkey-15
0,125	0,285	0,051	0,281		0,014	0,009	0,028	0,033	0,010	0,014	Turkey-18
0,088	0,296	0,069	0,302	0,111		0,013	0,032	0,031	0,010	0,010	Abkhazia-14
0,111	0,263	0,066	0,247	0,080	0,098		0,025	0,028	0,006	0,022	Abkhazia-18
0,227	0,050	0,214	0,055	0,268	0,291	0,260		0,010	0,024	0,023	Crimea-15
0,202	0,058	0,263	0,077	0,318	0,276	0,290	0,084		0,024	0,009	Caucasian-16
0,107	0,231	0,045	0,243	0,086	0,070	0,048	0,241	0,234		0,028	Caucasian-18
0,108	0,277	0,066	0,231	0,124	0,073	0,072	0,236	0,278	0,075		Caucasian-19

морфологии отолитов хамсы из промысловых скоплений, локализованных вдоль Кавказского рыбопромыслового района в зимнюю путину 2018 г., показал в среднем наличие 26 % рыб с черноморским морфотипом, а у берегов Республики Абхазия отмечалось до 53 % таких рыб.

## ВЫВОДЫ

На основе анализа изменчивости микросателлитных локусов отмечен высокий уровень изменчивости европейского анчоуса, что позволяет формировать единое азово-черноморское стадо, вполне приспособленное к условиям обитания, свободно мигрирующее и смешивающееся, что обеспечивает высокий уровень потока генов между отдельными нерестовыми популяциями. Фенотипическая подразделенность на азовскую и черноморскую подгруппы носит эпигенетический характер.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водясова Е.А., Абрамсон Н.И. Генетическая изменчивость анчоуса в Азово-Черноморском бассейне // Генетика. 2017. Т. 53, № 6. С. 696–704.
2. Aljanabi Salah M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. 1999. Vol. 25, no. 22. Pp. 4692–4693.
3. Ivanova N.V., de Waard J., Hebert P.D.N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Mol. Ecology Notes. 2006. Vol. 6. Pp. 998–1002.
4. Pakaki V., Magoulas A., Kasapidis P. New polymorphic microsatellite loci for population studies in the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.) // Mol. Ecol Res. 2009. Vol. 9. Pp. 1406–1409.
5. Karin D. Berg, Cynthia L. Glaser, Richard E. Thompson, Stanley R. Hamilton, Constance A. Griffin, and James R. Eshleman. Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction // Journal of Molecular Diagnostic. 2000. Vol. 2, no. 1. Pp. 20–28.
6. Darren J. Korbie & John S. Mattick Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification // Nat Protoc. 2008. 3 (9). Pp. 1452–1456, doi: 10.1038/nprot.2008. 133
7. Turan C., Tuncay S.S., Soldo A., Bosnic N. et al. Genetic Structure of Anchovy *Engraulis encrasicolus* in the Adriatic Sea using Microsatellite DNA Analysis // NESciences, 2017, 2 (2). Pp. 85–99, doi: 10.28978/nesciences.337793.
8. Chapuis M.P., and A. Estoup. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // Mol. Biol. Evol. 2007. 24(3). Pp. 621–631.
9. Zarraonaandia I., Pardo M.A., Iriondo M., Manzano C. et al. Microsatellite variability in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) calls for further investigation of its genetic structure and biogeography // ICES J. Mar. Sci. 2009. 66. Pp. 2176–2182.
10. Nei M. Genetic distance between populations // American Naturalist. 1972. Vol. 106 (949). Pp. 283–292.
11. Hartl D.L. & A.G. Clark. Principles of Population Genetics. 4<sup>th</sup> Edition. Sinauer Associates, 2007. 628 p.