

**Водные биоресурсы и среда обитания**  
 2019, том 2, номер 4, с. 73–84  
<http://journal.azniirkh.ru>, [www.azniirkh.ru](http://www.azniirkh.ru)  
 ISSN 2618-8147 print, ISSN 2619-1024 online



**Aquatic Bioresources & Environment**  
 2019, vol. 2, no. 4, pp. 73–84  
<http://journal.azniirkh.ru>, [www.azniirkh.ru](http://www.azniirkh.ru)  
 ISSN 2618-8147 print, ISSN 2619-1024 online

По материалам Азово-Черноморского бассейнового  
 научно-промышленного совета от 06–07.06.2019 г.

УДК 597.541:575.22

## МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЕВРОПЕЙСКОГО АНЧОУСА *ENGRAULIS ENCRASICOLUS* LINNAEUS, 1758

© 2019 Н. А. Небесихина<sup>1</sup>, А. Е. Барминцева<sup>2</sup>, Н. Н. Тимошкина<sup>1</sup>, Е. А. Водясова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ «ВНИРО»),  
 Азово-Черноморский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («АзНИИРХ»), Ростов-на-Дону 344002, Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии  
 (ФГБНУ «ВНИРО»), Москва 107140, Россия

<sup>3</sup>Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН академии наук,  
 Севастополь 299011, Россия

E-mail: nebesihina\_n\_a@azniirkh.ru

**Аннотация.** В Азово-Черноморском бассейне основу судового тралового промысла составляет европейский анчоус (хамса), эксплуатация которого осуществляется выделением двух единиц промыслового регулирования (двух популяций): «азовская хамса» и «черноморская хамса». Традиционно при освоении запаса «азовской хамсы» используется предосторожный подход, в противоположность этому при добыче «черноморской хамсы» сняты все ограничения. Для более точного прогноза по запасу и дальнейшего его рационального использования необходимо изучение межпопуляционной и внутривидовой структуры европейского анчоуса, обитающего в Азово-Черноморском бассейне. Исследовано 10 выборок европейского анчоуса (*Engraulis encrasicolus*) из Черного, Азовского, Адриатического морей и Бискайского залива по 6 микросателлитным локусам. Для уточнения внутривидового статуса анчоуса из Азово-Черноморского бассейна было использовано семь микросателлитных локусов. Кластерный анализ, анализ генетических расстояний (Fst) и главных компонент (PCA) показал наличие межпопуляционной дифференциации европейского анчоуса, приуроченной к трем морским бассейнам. Анализ AMOVA показал высокий уровень внутривидовой изменчивости (96 %) у европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне, поддерживаемый за счет активной миграции внутри ареала. Анализ генетической изменчивости STR-локусов у различных нерестовых групп и морфогрупп азово-черноморского анчоуса не выявил внутривидовой дифференциации. Фенотипическое деление азово-черноморской хамсы носит паратипический характер. Учитывая отсутствие внутривидовой дифференциации между «азовской» и «черноморской» хамсой, важен рационально-сбалансированный подход к освоению общего запаса азово-черноморской хамсы, не допускающий его перелома.

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

**MICROSATELLITE VARIABILITY OF THE EUROPEAN ANCHOVY  
*ENGRAULIS ENCRASICOLUS* LINNAEUS, 1758**

**N. A. Nebesikhina<sup>1</sup>, A. E. Barmintseva<sup>2</sup>, N. N. Timoshkina<sup>1</sup>, E. A. Vodyasova<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI “VNIRO”),  
Azov-Black Sea Branch of the FSBSI “VNIRO” (“AzNIIRKH”), Rostov-on-Don 344002, Russia

<sup>2</sup>Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI “VNIRO”), Moscow 107140, Russia

<sup>3</sup>A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS, Sevastopol 299011, Russia  
E-mail: nebesikhina\_n\_a@azniirkh.ru

**Abstract.** In the Azov and Black Sea Basin, the European anchovy accounts for the majority of trawl fleet fishing; its exploitation is carried out in the context of distinguishing two populations of stock management: the “Azov anchovy” and the “Black Sea anchovy”. Conventionally, exploitation of the “Azov anchovy” stock is conducted using precautionary approach, and, on the contrary, the “Black Sea anchovy” fishing is not under any limitations. To make a more accurate forecast of the anchovy stock and achieve its sustainable yield, it is necessary to study inter- and intrapopulation composition of the Azov and Black Sea anchovy. Ten samples of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) from the Black, Azov and Adriatic Seas, and the Bay of Biskay have been investigated by six microsatellite loci. To ascertain intraspecific status of the anchovy from the Azov and Black Sea Basin, 7 microsatellite loci have been used. Cluster analysis, analysis of genetic distances (Fst), and principal component analysis (PCA) have shown the existence of differentiation between populations of the European anchovy that coincided with three marine basins. AMOVA analysis has shown a high level of intrapopulation variance (96 %) in the European anchovy from the Azov and Black Sea Basin, maintained by means of active migration within the range of this species. Analysis of genetic variability of STR-loci in different spawning groups and morpho-groups of the Azov and Black Sea anchovy has not identified intraspecific differentiation. Phenotypic distinction of the Azov and Black Sea anchovy is paratypical. Taking into account the absence of intraspecific differentiation between the “Azov” and “Black Sea” anchovy, it can be concluded that it is important to take a rational and balanced approach to utilization of the common Azov and Black Sea anchovy stock to avoid its overfishing.

**Keywords:** European anchovy, *Engraulis encrasicolus*, Azov Sea, Black Sea, genetic structure, microsatellite loci (STR)

## ВВЕДЕНИЕ

Европейский анчоус (*Engraulis encrasicolus*) широко распространен вдоль восточного побережья Атлантики от Скандинавии до Западной Африки, а также в Средиземном, Черном и Азовском морях. В Азово-Черноморском бассейне европейский анчоус (хамса) представляет собой один из наиболее массовых видов рыб, который, тем не менее, за последние три десятилетия претерпел резкое снижение численности в связи с массовым размножением пищевого конкурента *Mnemiopsis* sp. и перевыловом, а затем восстановление общего запаса до уровня 500 тыс. т [1]. В настоящее время анчоус остается важнейшим промысловым объектом для целого ряда причерноморских стран. Именно поэтому четкое знание особенностей внутривидовой организации и пространственной структуры европейского анчоуса в этом регионе важно для сохранения данного вида и регулирования его промысла.

Более века назад в Черном море на основании фенотипических и морфологических признаков были описаны две расы хамсы — черноморская и азовская [2, 3]. Однако споры об их систематическом статусе не закончены до сих пор. Исследования, проведенные с помощью различных морфометрических и биохимических маркеров (аллозимы, иммунологические признаки), как правило, обнаруживали подвидовые различия между черноморской и азовской группами анчоуса [4–7]. Тем не менее, позже анализ белковых локусов не выявил доказательств подвидовых различий, что авторы объясняют интрогрессивной гибридизацией, не отказываясь от гипотезы изначально отсроченного заселения Черного моря двумя группами предков современного анчоуса [8].

Использование митохондриальной ДНК [9–12], особенно микросателлитов [13, 14], как более полиморфных маркеров позволили дать оценку популяционной структуре анчоуса из различных

ареалов обитания, выявить современные уровни генных потоков между популяциями и реконструировать биогеографические сценарии расселения этого вида.

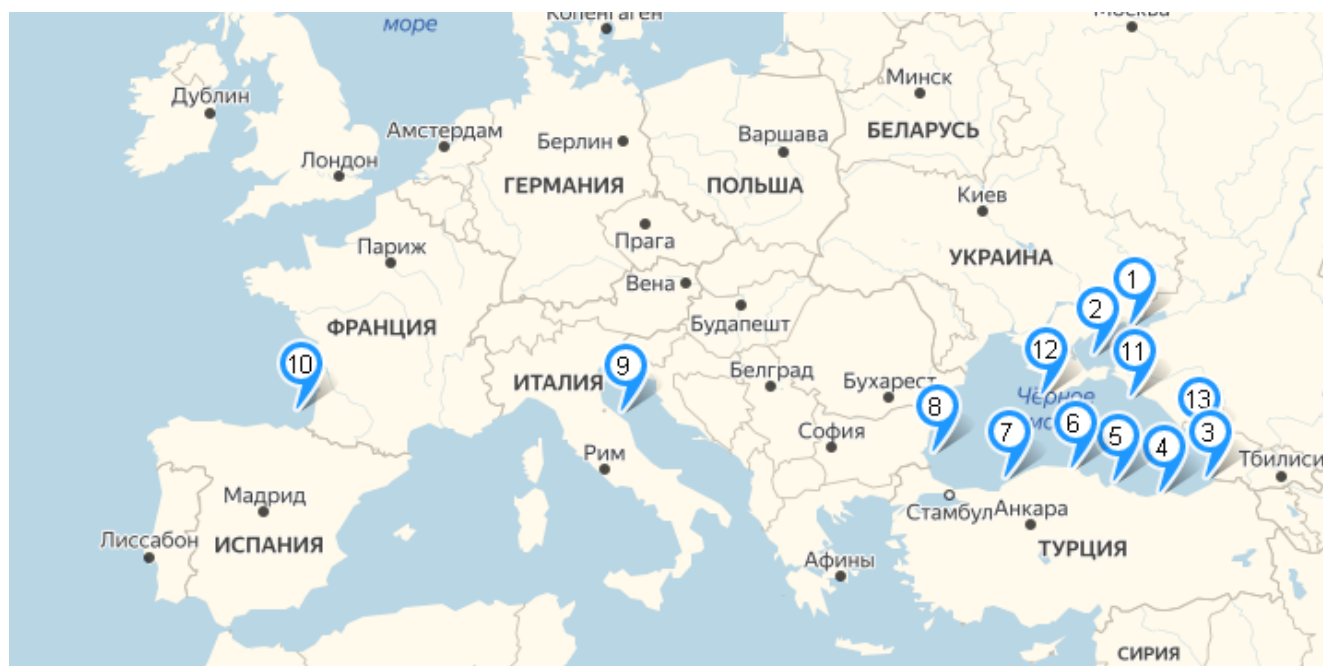
Следует отметить, что, несмотря на то, что проводится достаточно большое количество работ по исследованию внутривидовой структурной дифференциации как европейского анчоуса в целом, так и азово-черноморской хамсы в частности, уровень таксономических различий между черноморским и азовским анчоусами до настоящего времени остается неопределенным. В настоящей работе мы исследовали генетическую структуру европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне, находящегося в стадии восстановления численности после резкого спада в 2000-х гг. [1], в сравнении с выборками из Бискайского залива и Адриатического моря.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили 10 выборок европейского анчоуса, отобранного вдоль южного побережья Черного моря (Black,  $n=74$ ), из Азовского моря (Azov,  $n=37$ ), Бискайского залива (Atl,  $n=49$ ) и Адриатического моря (Med,  $n=14$ ), собранные в преднерестовый и нерестовый

периоды 2015–2017 гг. В исследование также вошли 138 особей азово-черноморской хамсы из промысловых уловов 2015–2017 гг. в прибрежной зоне Анапы (An,  $n=30$ ), Севастополя (Sev,  $n=51$ ) и Абхазии (Abh,  $n=57$ ). Ориентировочные места отбора проб указаны на рис. 1. Для всех особей проведен морфологический анализ отоликов, как описано в работе Е.А. Водясовой [15]. Данные об образцах депонированы в «Каталоге коллекции тканей хамсы (европейского анчоуса) (*Engraulis encrasicolus*) для молекулярно-генетического анализа» (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2015621737 от 07.12.2015 г.). Образцы соматических тканей хранили в 95%-ном этаноле при температуре  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Из проб, которые были предварительно заморожены, а впоследствии переведены в 96%-ный спирт, проведено выделение ДНК солевым методом [16] с нашими модификациями: использование для лизиса тканевого образца Протеиназы К в концентрации 0,1 мг/мл в лизирующем буфере, с итоговой доочисткой препаратов тотальной ДНК с помощью набора «ДНК-сорб-С» (Интерлабсервис) или набором «БиоСилика». Из проб, которые сразу были фиксированы 96%-ным спиртом, выделение ДНК проведено методом абсорбции на колонках (PALL) [17]. Концентрацию ДНК определяли на флуори-



**Рис. 1.** Карта-схема района отбора проб европейского анчоуса. Районы 1–2 — выборка Azov; 3–8 — выборка Black; 9 — выборка Med; 10 — выборка Atl; 11 — выборка An; 12 — выборка Sev; 13 — выборка Abh

**Fig. 1.** Outline map of the sampling area for the European anchovy. Areas 1–2 — sample Azov; 3–8 — sample Black; 9 — sample Med; 10 — sample Atl; 11 — sample An; 12 — sample Sev; 13 — sample Abh

метре MaxLifeH100 (ООО «МВМ-Диагностика», Россия).

STR-генотипирование проводили по десяти микросателлитным локусам (Ee2-508, Ee2-135, Ee2-483b, Ee2-91b, Ee2-407, Ee2-477, Ee2-91a, Ee2-165, Ee5-376, Ee2-452), ранее использованным в анализе европейского анчоуса средиземноморской и атлантической популяций [18]. В табл. 1 указаны основные характеристики используемых локусов. Локусы были объединены в три мультиплексные ПЦР реакции. Каждую ПЦР выполняли в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 50–100 нг ДНК; по 0,4 мМ меченных флуоресцентным

красителем прямых праймеров, по 4 пкМ обратных (не меченных) праймеров; 1× буфер (ООО «НПФ Синтол»); 1,8 мМ MgCl<sub>2</sub> (ООО «НПФ Синтол»); 0,8 единиц Taq-полимеразы («Силекс») и 0,2 мМ dNTP (Thermo Scientific). 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.

**Таблица 1.** Характеристика микросателлитных локусов, использованных для генотипирования европейского анчоуса

**Table 1.** Characteristics of the microsatellite loci, used for the European anchovy genotyping

Локус Locus	Прямой (F) и обратный (R) праймеры Forward (F) and reverse (R) primer	Метка Tag	Повто- ряющаяся копия Sequence repeat	Размерный диапазон, пн Size range, base pairs	№ Генбанка GenBank no.
Ee2-91a *	F: AGAGCAGGTTCTTGCTGTGG R: TGTGGTGCCTACTATCAGG	R6G	(AGG)12	117–184	FJ534732
Ee2-91b §	F: GGTCTTGAGCTTGGCATAGG R: CCGGAAGACACTCTGCACAC	FAM	(CCGCA)8	105–150	FJ534732
Ee2-135 &	F: AGGGCAGTGACAGGAGAGTC R: TCGTTACCCTGCGTTTATACTG	R6G	(ATTAG)10	212–316	FJ534738
Ee2-165b *	F: GGGTGGGTAAAGATGAAGC R: AGGGATCTTCAGGGAACCAG	FAM	(CCT)7	257–281	FJ534742
Ee2-376 *	F: CCACACCTACGGTGAGTGAC R: CAAAGAGAATAGCACATGCAG	R6G	(TG)11	170–240	FJ534788
Ee2-407 §	F: AGGAATCTCCTTCCCGTCTC R: GTGGGTCTGTGGGTGTTTGTG	R6G	(CA)13	152–223	FJ534751
Ee2-452a *	F: CCCAACCCTAGGGAGACATC R: TCGTTCAGCAAGCATAACACC	TAMRA	(AC)13	254–290	FJ534754
Ee2-477 §	F: TTGGTGAGGAAGCAACAGTG R: TAAGATGGCACGCTGACTTG	TAMRA	(AGG)7	117–230	FJ534755
Ee2-483b &	F: ATGAGAAGGAGGACGGTGTG R: AATGGGATAGCTCGTTGTGC	TAMRA	(AGG)11	206–236	FJ534757
Ee2-508 &	F: CACATGCTCGCTAAACATTG R: ACCTGATGCTGCTTGGTAGC	FAM	(AGG)8	182–195	FJ534759

Примечание: \* — Мультиплекс 1; § — Мультиплекс 2; & — Мультиплекс 3

Note: \* — Multiplex 1; § — Multiplex 2; & — Multiplex 3

Продукты амплификации были разделены с помощью капиллярного электрофореза на «ABI3100/3130 Genetic analyzer». Полученные первичные данные обрабатывали с помощью программы «Gene Marker» (Soft Genetics LLC.).

Используя GenAlEx v.6 [19], для каждой выборки подсчитывали среднее число аллелей на локус

(A), число эффективных аллелей (AR), частоту встречаемости частных аллелей (prA), наблюдаемую (Ho) и ожидаемую (He) гетерозиготность, Fis — коэффициент инбридинга, для объединенных данных выполняли анализ PCoA и AMOVA. Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга (HWE) в выборках и популяциях по всем локусам оценива-

ли с помощью Global Test в программе GenePop v.4 [20]. Наличие и частоту нулевых аллелей проверяли в FreeNA [21]. Структурированность азово-черноморского анчоуса анализировали в программе Structura v.2.3.4 [22] с последующей обработкой данных в синтаксическом анализаторе Structura Harvester [23]. Эффект «бутылочного горлышка» рассчитывали в программе Bottleneck v.1.2.02 [24], используя двухэтапную модель образования мутаций (TRM).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из десяти апробированных локусов четыре (Ee5-376, Ee2-452, Ee2-477, Ee2-91a) оказались непригодными для анализа вследствие плохой амплификабельности (получен ПЦР-продукт менее чем для 80 % особей или не для всех выборок). В итоге для анализа генетической структуры европейского анчоуса было отобрано шесть полиморфных локусов, а анализ азово-черноморской хамсы базировался на данных по семи локусам.

Согласно полученным данным по всем локусам был отмечен высокий полиморфизм (табл. 2). Наименьшая вариабельность была отмечена для локуса Ee2-407 (A=6), наибольшая — для локуса Ee2-407 (A=28). Суммарно было идентифицировано 65 аллелей. Эффективное количество аллелей на локус, рассчитанное на минимальную выборку, варьировало от 2,72 до 4,48. Все маркеры проде-

монстрировали высокий уровень ожидаемой гетерозиготности от 0,537 до 0,843. Значимые отклонения от равновесия Харди-Вайнберга были зафиксированы для двух из шести локусов. Значение частоты нуль-аллелей <0,25 отмечено только в локусах Ee2-508 и Ee2-483b.

Во всех выборках азово-черноморской хамсы (табл. 3) — как нерестовых, так и промысловых, — обнаружен примерно сходный уровень вариабельности по показателям аллельного разнообразия и ожидаемой гетерозиготности. Значимых отклонений от равновесия Харди-Вайнберга не было зафиксировано ни для одной выборки. Доказательств прохождения азово-черноморскими популяциями «бутылочно-горлышка» обнаружено не было ( $p>0,05$ ).

В целом значения  $F_{st}$  для выборок нерестовой части азово-черноморской хамсы не были значимы и находились в пределах 0,006–0,017. Наибольшее генетическое расстояние было обнаружено между популяциями Азовского и Адриатического морей ( $F_{st}=0,070$ ) и Азовского моря и Бискайского залива ( $F_{st}=0,062$ ) (табл. 4). Схожие результаты были получены при изучении европейского анчоуса в водах Турции [25].

С применением метода анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) был рассчитан уровень внутри- и межпопуляционной генетической изменчивости анчоуса в Азово-Черноморском бассейне, который показал высокий уровень внутривидовой изменчивости.

**Таблица 2.** Характеристика статистических данных для микросателлитных локусов

**Table 2.** Characterization of statistical features for microsatellite loci

Локус Locus	N	A	AR	MeanHo	MeanHe	Fis	HWE	Null
Ee2-508	202	14	3,04	0,212	0,537	0,605	***	0,25
Ee2-135	205	11	4,25	0,727	0,843	0,137	ns	0,08
Ee2-483b	176	10	3,84	0,303	0,599	0,494	***	0,22
Ee2-91b	205	10	3,85	0,717	0,793	0,096	ns	0,06
Ee2-407	200	28	4,48	0,729	0,839	0,131	*	0,05
Ee2-165	201	6	2,72	0,511	0,729	0,091	**	0,04

Примечание: N — размер выборки; A — кол-во аллелей на локус; AR — эффективное кол-во аллелей; MeanHo — среднее значение наблюдаемой гетерозиготности; MeanHe — среднее значение ожидаемой гетерозиготности; Fis — коэффициент инбридинга; Null — частота нуль-аллелей; HWE — равновесие Харди-Вайнберга; уровень достоверности \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$ , ns — отсутствуют отклонения от равновесия Харди-Вайнберга

Note: N — number of individuals; A — number of alleles per one locus; AR — effective number of alleles; MeanHo — average value of the observed heterozygosity; MeanHe — average value of the expected heterozygosity; Fis — inbreeding coefficient; Null — frequency of null alleles; HWE — Hardy-Weinberg equilibrium; confidence level \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ , ns — no deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium

**Таблица 3.** Характеристика выборок азово-черноморской хамсы по STR-локусам**Table 3.** Characterization of samples of the Azov and Black Sea anchovy by STR-loci

Выборка Sample	N	Na	Ne	Ho	He	Fis	HWE	Null
Azov	67	10,2	4,97	0,590	0,771	0,243	ns	0,098
Black	75	9,0	4,58	0,633	0,752	0,165	ns	0,133
An	30	8,3	4,44	0,594	0,760	0,209	ns	0,087
Sev	50	8,7	4,82	0,590	0,762	0,227	ns	0,08
Abh	60	9,5	4,83	0,515	0,745	0,322	ns	0,111

Примечание: N — размер выборки; Na — количество аллелей на выборку; Ne — количество эффективных аллелей; Ho — наблюдаемая гетерозиготность; He — ожидаемая гетерозиготность; Fis — коэффициент инбридинга; Null — частота нуль-аллелей; HWE — равновесие Харди-Вайнберга; ns — отсутствуют отклонения от равновесия Харди-Вайнберга

Note: N — number of individuals; A — number of alleles per one sample; Ne — number of effective alleles; Ho — observed heterozygosity; He — expected heterozygosity; Fis — inbreeding coefficient; Null — frequency of null alleles; HWE — Hardy-Weinberg equilibrium; ns — no deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium

**Таблица 4.** Над диагональю — оценки показателей попарных генетических расстояний (Fst), под диагональю — процента мигрантов ( $N_m$ ) между различными популяциями европейского анчоуса в преднерестовый и нерестовый периоды**Table 4.** Over the diagonal: pairwise genetic distances (Fst); under the diagonal: percentages of migrating species ( $N_m$ ) evaluated for different populations of the European anchovy during the pre-spawning and spawning periods

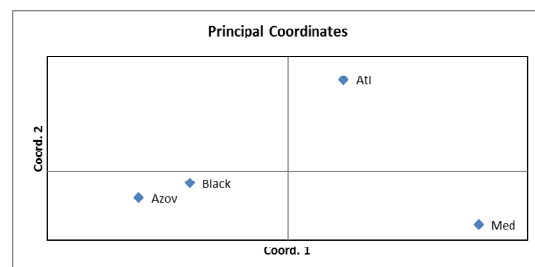
Морской бассейн Marine Basin	Бискайский залив Bay of Biscay	Адриатическое море Adriatic Sea	Черное море Black Sea	Азовское море Azov Sea
Бискайский залив Bay of Biscay		0,034	0,043	0,062
Адриатическое море Adriatic Sea	7,3		0,058	0,070
Черное море Black Sea	5,5	4,1		0,009
Азовское море Azov Sea	3,8	3,3	27,1	

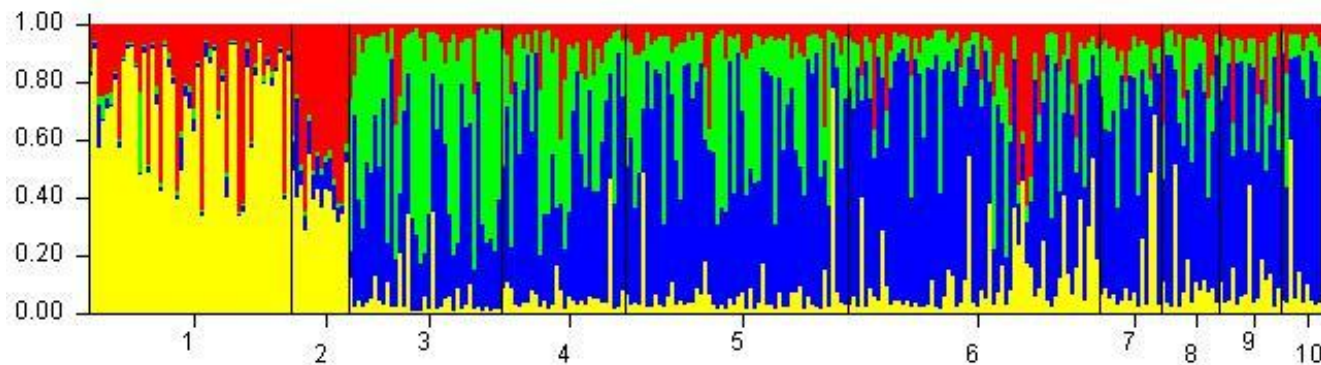
ной изменчивости — 96 %; на долю межпопуляционной изменчивости приходится всего 4 %.

Анализ главных координат наглядно отражает характер дифференцировки исследованных выборок (рис. 2). Наиболее дистанцированными оказались выборки анчоуса Азово-Черноморского региона от групп сравнения из Адриатического моря и Бискайского залива. Особи из Азовского и Черного морей проецируются на вторую ось координат рядом.

Кластерный анализ с последующей обработкой в Structure Harvester продемонстрировал наиболее вероятный уровень дифференциации исследованной группы анчоуса на три географически удаленных кластера, где азовская и черноморская хамса объединяются в один кластер (рис. 3). При этом

изменение заданного числа кластеров не разделяет азовских и черноморских рыб.

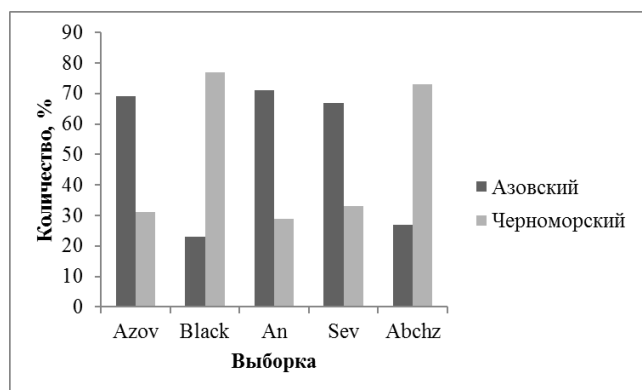
**Рис. 2.** PCoA-диаграмма в системе двух координат для популяций европейского анчоуса в преднерестовый и нерестовый периоды**Fig. 2.** PCoA diagram in a two-coordinate system for the European anchovy populations during the pre-spawning and spawning periods



**Рис. 3.** Диаграмма кластеризации европейского анчоуса из различных морских бассейнов в преднерестовый и нерестовый периоды в программе STRUCTURE. 1 — Atl; 2 — Med; 3–4 — Azov; 5–10 — Black

**Fig. 3.** A cluster diagram of the European anchovy from different marine basins during the pre-spawning and spawning periods drawn by applying the STRUCTURE software program. 1 — Atl; 2 — Med; 3–4 — Azov; 5–10 — Black

Частота особей с «азовским» и «черноморским» морфотипами отолитов [15] в разных группах азово-черноморской популяции анчоуса отражена на рис. 4. Согласно нашим данным, в нерестовых группах (Azov и Black) преобладал морфотип, соответствующий географической локализации стада. В смешанных нагульных стадах северо-западной (Sev) и северо-восточной (An) локализаций преобладал «азовский» морфотип, в восточной части Черного моря — «черноморский» морфотип.



**Рис. 4.** Процентное соотношение морфотипов отолитов в выборках азово-черноморского анчоуса

**Fig. 4.** The percentage ratio of otolith morphotypes in the samples of the Azov and Black Sea anchovy

Многолетние исследования анчоуса разной географической локализации выделяли внутреннюю неоднородность, которую связывали как с биогеографической историей вида, так и со сложным рельефом прибрежных ареалов обитания этого морского вида рыб, определенная часть которого предпочитает мелководье.

Для анчоуса, обитающего в Азово-Черноморском бассейне, описывали значительные различия между азовской и черноморскими расами/подвидами по распределению групп крови, биохимическому составу белков и липидов [4–7].

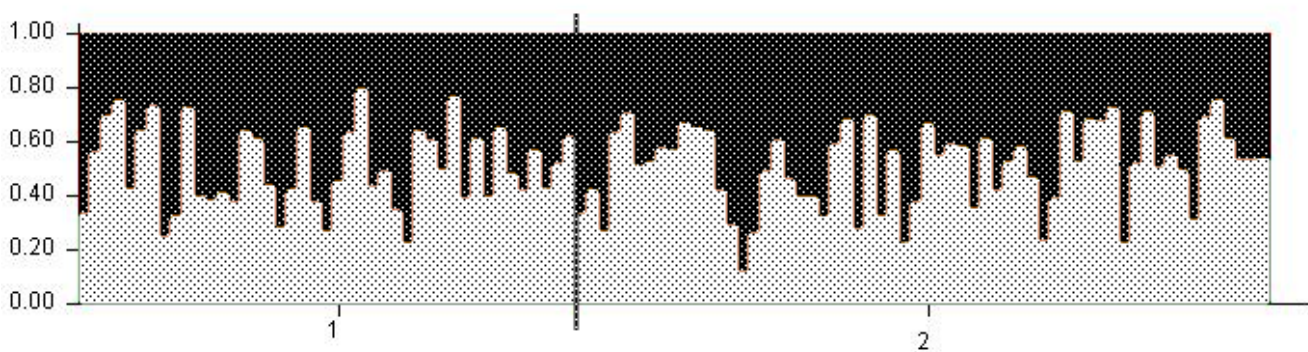
Маркеры мтДНК также использовали для видовой идентификации и исследований внутривидовой дивергенции анчоуса, при этом популяции европейского анчоуса показывают более высокое генетическое расхождение по сравнению с другими видами анчоуса [11]. Исторически ранее были выделены два отдельных кластера (филады) у европейского анчоуса, предположительно длительное время эволюционировавшие изолированно друг от друга, что согласуется с геологической информацией [10].

В нашей работе азово-черноморская хамса как из нерестовых скоплений, так и из нагульных стад не демонстрировала значимых различий в противовес группам сравнения из Бискайского залива и Адриатического моря (рис. 2, 3) на фоне схожих показателей генетического разнообразия по использованным STR-локусам (табл. 2, 3). Проведенный ранее анализ современных групп европейского анчоуса на основе данных изменчивости фрагмента гена *Cytb* также не выявил кластеризации азовской и черноморской рас; более того, в Азово-Черноморском бассейне была идентифицирована лишь клада A [10]. Одно из возможных объяснений несовпадения сложившихся представлений о разделении азово-черноморской хамсы на два подвида с нашими данными и с другими исследованиями современной популяции заключается в изменении популяционно-генетической структуры вследствие падения численности, особенно азовского стада, в начале

2000-х гг. Последовавшее затем восстановление запасов хамсы, очевидно, осуществлялось преимущественно за счет черноморского стада.

Интересен опыт использования индекса отоли-тов для выделения также двух форм анчоуса — «веретеновидная» форма отоли-тов (черноморской морфотип) и «эллипсоидная» форма отоли-тов (азовский морфотип) [26]. Однако подобное разделение анчоуса, связанное с экологической структурой, было описано и в других ареалах обитания вида [27]. «Эллипсоидная» форма отоли-тов ассоциировалась с «прибрежным» экотопом, «веретено-видная» — с глубоководным.

Было проведено исследование нерестовых выборок европейского анчоуса из Азовского и Черного морей по априорному отнесению той или иной особи к черноморскому или азовскому морфотипу на основании морфологии отоли-тов, и сформированы две соответствующие выборки. В дальнейшем был проведен кластерный анализ этих выборок в программе STRUCTURE с параметрами (no admixture, no priors) при  $K=2$ . Генетической дифференциации между выборками европейского анчоуса с азовским и черноморским морфотипами не выявлено, что наглядно демонстрирует диаграмма (рис. 5).



**Рис. 5.** Диаграмма кластеризации европейского анчоуса по показателям частот аллелей микросателлитных локусов выполненная в программе STRUCTURA для выборок, полученных на основании морфологии отоли-тов. 1 — «Азовский морфотип»; 2 — «Черноморский морфотип»; темная заливка — вероятность принадлежности особи к азовской популяции, светлая — к черноморской

**Fig. 5.** A cluster diagram for allele frequencies of microsatellite loci of the European anchovy performed in the STRUCTURE software program for the samples obtained on the basis of otolith morphology. 1 — “Azov morphotype”; 2 — “Black Sea morphotype”; dark colour — probability of specimen belonging to the Azov Sea population, light colour — to the Black Sea population

Выявленный поток генов между нерестовыми популяциями анчоуса не позволяет говорить о существовании двух изолированных популяций; превышение 10%-ного порога по этому показателю препятствует эффективной изоляции рыб с длительным жизненным циклом, не говоря уже о короткоцикловом анчоусе (продолжительность жизни 3–4 года). Азовская хамса обитает в Азовском море только летом, затем мигрирует в разные районы Черного моря вдоль побережья Крыма, Грузии и Турции в составе больших смешанных косяков (рис. 4). Долгосрочный мониторинг показал, что зимовальная миграция азовского анчоуса может иметь альтернативные пути вдоль западного побережья Черного моря [28]. Кроме того, в этой же работе было зарегистрировано появление азовского анчоуса у берегов Болгарии в период нереста. Приведенные данные свидетельствуют об

отсутствии серьезных экологических и географических барьеров для изоляции отдельных популяций анчоуса в Азовском и Черном морях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, высокий уровень изменчивости европейского анчоуса позволяет формировать единое азово-черноморское стадо, свободно мигрирующее по основному ареалу, что обеспечивает высокий уровень потока генов между отдельными нерестовыми популяциями и тем самым позволяет эффективно реагировать на изменения условий обитания.

Данные, полученные в результате настоящего исследования, оказались полезными для идентификации азово-черноморской популяции европейского анчоуса, что также может послужить для планирования рационального рыболовства на бассейне.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chashchin A., Shlyakhov V.A., Dubovik V.E., Negoda S. Stock assessment of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L) in Northern Black Sea and Sea of Azov // Progressive engineering practices in marine resource management. I. Zlateva, N. Raykov, N. Nykolov. (Eds.). Hershey: IGI Global, 2015. Pp. 209–243. doi:10.4018/978-1-4666-8333-4.ch006.
2. Зернов С.А. К вопросу об изучении жизни Черного моря // Записки Императорской Академии Наук по физико-математическому отделению. Серия 8. 1913. Т. 32, вып. 1. С. 2–299.
3. Максимов Н.Е. Образ жизни промысловых рыб и их лов у берегов Болгарии и Румынии в западной части Черного моря // Ежегодник Зоологического музея Академии Наук. 1913. Т. 18. С. 1–52.
4. Алтухов Ю.П., Лиманский В.В., Паюсова А.Н., Трувеллер К.А. Иммуногенетический анализ внутривидовой дифференцировки европейского анчоуса, обитающего в Черном и Азовском морях. Сообщение 1. Группы крови анчоуса и возможный механизм генного контроля. Гетерогенность азовской расы // Генетика. 1969. Т. 5, № 4. С. 50–64.
5. Калнина О.В., Калнин В.В. Генетическая дифференциация и репродуктивные взаимоотношения азовской и черноморской рас европейского анчоуса. Сообщение 2. Генетические отличия и внутренняя гетерогенность азовской и черноморской рас анчоуса // Генетика. 1984. Т. 20, № 2. С. 309–313.
6. Калнин В.В., Калнина О.В. Генетическая дифференциация и репродуктивные взаимоотношения азовской и черноморской рас европейского анчоуса. Сообщение 3. Интрогрессивная гибридизация рас и популяционная структура анчоуса Черного моря // Генетика. 1985. Т. 21, № 8. С. 1352–1360.
7. Юнева Т.В., Забелинский С.А., Никольский В.Н., Щепкина А.М., Бат Л., Кая Я., Сейхан К., Шулман Г.Е. Идентификация азовской и черноморской хамсы в Черном море у берегов Украины и Турции в промысловый период 2006–2012 гг. на основе содержания в фосфолипидах докозагексаеновой кислоты // Морський екологічний журнал. 2014. Т. 13, № 2. С. 82–89.
8. Ivanova P.P., Dobrovolov I.S., Bat L., Kideys A.E., Nikolsky V.N., Yuneva T.V., Shchepkina A.M., Shulman G.E. Application of esterase polymorphism to specify population genetic structure of *Engraulis encrasicolus* (Pisces: Engraulidae) in the Black and Azov Seas // Морський екологічний журнал. 2013. Т. 12, № 4. С. 45–52.
9. Водясова Е.А., Абрамсон Н.И. Филогеография европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* // Морские биологические исследования: достижения и перспективы : матер. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (г. Севастополь, 19–24 сентября 2016 г.). Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2016. Т. 1. С. 381–384.
10. Magoulas A., Tsimenides N., Zouros E. Mitochondrial DNA phylogeny and the reconstruction of the population history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) // Molecular Biology and Evolution. 1996. Vol. 13, issue 1. Pp. 178–190. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025554.
11. Keskin E., Atar H.H. Genetic structuring of European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) population through mitochondrial DNA sequences // Mitochondrial DNA. 2012. Vol. 23, issue 2. Pp. 62–69. doi: 10.3109/9401736.2011.653798.
12. Silva G., Lima F.P., Martel P., Castilho R. Thermal adaptation and clinal mitochondrial DNA variation of European anchovy // Proceeding of the Royal Society B (Biological Sciences). 2014. Vol. 281, issue 1792. Pp. 1–9. doi: 10.1098/rspb.2014.1093.
13. Zarraonaindia I., Pardo M.A., Iriondo M., Manzano C., Estonba A. Microsatellite variability in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) calls for further investigation of its genetic structure and biogeography // ICES Journal of Marine Science. 2009. Vol. 66, issue 10. Pp. 2176–2182. doi: 10.1093/icesjms/fsp187.
14. Ruggeri P., Splendiani A., Occhipinti G., Fioravanti T., Santojanni A., Leonori I., De Felice A., Arneri E., Procaccini G., Catanese G., Ticina V., Bonanno A., Cerioni P.N., Giovannotti M., Grant W.S., Barucchi V.C. Biocomplexity in populations of European anchovy in the Adriatic Sea // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, issue 4. e0153061. doi: 10.1371/journal.pone.0153061.
15. Водясова Е.А. Новый морфологический критерий для анализа неоднородных скоплений хамсы // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. 2013. Т. 3, № 56. С. 38–42.
16. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Research. 1997. Vol. 25, no. 22. Pp. 4692–4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692.
17. Ivanova P.P., Dobrovolov I.S. Population – genetic structure on European anchovy (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) (Osteichthyes: Engraulidae) from Mediterranean Basin and Atlantic Ocean // Acta Adriatica. 2006. Vol. 47, no. 1. Pp. 13–22.
18. Pakaki V., Magoulas A., Kasapidis P. New polymorphic microsatellite loci for population studies in the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.) // Molecular Ecology Resources. 2009. Vol. 9, issue 5. Pp. 1406–1409. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02681.x.
19. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. 2006. Vol. 6, issue 1. Pp. 288–295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.

20. Raymond M., Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism // *Journal of Heredity*. 1995. Vol. 86, issue 3. Pp. 248–249. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.
21. Chapuis M.-P., Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // *Molecular Biology and Evolution*. 2007. Vol. 24, no. 3. Pp. 621–631. doi: 10.1093/molbev/msl191.
22. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000. Vol. 155, issue 2. Pp. 945–959.
23. Earl D.A., Von Holdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Conservation Genetics Resources*. 2012. Vol. 4, issue 2. Pp. 359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
24. Cornuet J.M., Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data // *Genetics*. 1996. Vol. 144, issue 4. Pp. 2001–2014.
25. Tuncay S.S., Bardakci F. Population genetics of European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the seas of Turkey based on microsatellite DNA // *Frontiers in Marine Science*. 2014. Vol. 1. doi: 10.3389/fofmars.2014.02.00154.
26. Сказкина Е.П. Различие азовской и черноморской хамсы (*Engraulis encrasicolus maeoticus* Puzanov, *Engraulis encrasicolus ponticus* Aleks.) по отолитам // *Вопросы ихтиологии*. 1965. Т. 5, № 4. С. 600–605.
27. Karahan A., Borsa P., Gucu A.C., Kandemir I., Ozkan E., Orek A.Y., Acan S.C., Koban E., Togan I. Geometric morphometrics, Fourier analysis of otolith shape, and nuclear-DNA markers distinguish two anchovy species (*Engraulis* spp.) in the Eastern Mediterranean Sea // *Fisheries Research*. 2014. Vol. 159. Pp. 45–55.
28. Зуев Г.В. Внутривидовая дифференциация и распространение европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* (L.) (Pisces: Engraulidae) в Черном и Азовском морях // *Морський екологічний журнал*. 2014. Т. 13, № 3. С. 19–31.
3. Maksimov N.E. Obraz zhizni promyslovykh ryb i ikh lov u beregov Bolgarii i Rumynii v zapadnoy chasti Chernogo morya [Way of life of commercial fish species and their fishing off the shores of Bulgaria and Romania in the western part of the Black Sea]. *Ezhegodnik Zoologicheskogo muzeya Akademii Nauk [Annual of the Zoological Museum of the Academy of Sciences]*, 1913, vol. 18, pp. 1–52. (In Russian).
4. Altukhov Yu.P., Limanskiy V.V., Payusova A.N., Truveller K.A. Immunogeneticheskiy analiz vnutrividovoy differentsirovki evropeyskogo anchousa, obitayushchego v Chernom i Azovskom moryakh. Soobshchenie 1. Gruppy krovi anchousa i vozmozhnyy mekhanizm gennogo kontrolya. Geterogennost' azovskoy rasy [Immunogenetical analysis of intraspecific differentiation of the European anchovy from the Black and Azov Seas. 1. The blood groups and possible mechanism of genetic control. Heterozygosity of the Azov Sea race]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*, 1969, vol. 5, no. 4, pp. 50–64. (In Russian).
5. Kalnina O.V., Kalnin V.V. Geneticheskaya differentsiatsiya i reproductivnye vzaimootnosheniya azovskoy i chernomorskoy ras evropeyskogo anchousa. Soobshchenie 2. Geneticheskie otlichiya i vnutrennyaya geterogennost' azovskoy i chernomorskoy ras anchousa [Genetic differentiation and reproductive relationship between the Black-Sea race and the Azov Sea race of the European anchovy. 2. Genetic differences between the Black-Sea race and the Azov Sea race and their intraracial heterogeneity]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*, 1984, vol. 20, no. 2, pp. 309–313. (In Russian).
6. Kalnin V.V., Kalnina O.V. Geneticheskaya differentsiatsiya i reproductivnye vzaimootnosheniya azovskoy i chernomorskoy ras evropeyskogo anchousa. Soobshchenie 3. Introgressivnaya gibridizatsiya ras i populyatsionnaya struktura anchousa Chernogo morya [Genetic differentiation and reproductive relationship of Azov and Black-Sea races of European anchovy. 3. Introgressive race hybridization and population-structure of Black-Sea anchovy]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*, 1985, vol. 21, no. 8, pp. 1352–1360. (In Russian).
7. Yuneva T.V., Zabelinskiy S.A., Nikol'skiy V.N., Shchepkina A.M., Bat L., Kaya Ya., Seykhan K., Shul'man G.E. Identifikatsiya azovskoy i chernomorskoy khamsy v Chernom more u beregov Ukrainy i Turtsii v promyslovyy period 2006–2012 gg. na osnove sodержaniya v fosfolipidakh dokozageksaenovoy kisloty [Identification of the Azov and Black Sea anchovy in the Black Sea off the coast of Ukraine and Turkey during fishing period 2006–2012 years based on the content of docosahexaenoic fatty acid in phospholipids]. *Mors'kiy*

## REFERENCES

1. Chashchin A., Shlyakhov V.A., Dubovik V.E., Negoda S. Stock assessment of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L) in Northern Black Sea and Sea of Azov. In: *Progressive engineering practices in marine resource management*. I. Zlateva, N. Raykov, N. Nykolov. (Eds.). Hershey: IGI Global, 2015, pp. 209–243. doi:10.4018/978-1-4666-8333-4.ch006.
2. Zernov S.A. K voprosu ob izuchenii zhizni Chernogo morya [On the study of life in the Black Sea]. *Zapiski Imperatorskoy Akademii Nauk po fiziko-*

- ekologichnyy zhurnal [Marine Ecological Journal]*, 2014, vol. 13, no. 2, pp. 82–89. (In Russian).
8. Ivanova P.P., Dobrovlov I.S., Bat L., Kideys A.E., Nikolsky V.N., Yuneva T.V., Shchepkina A.M., Shulman G.E. Application of esterase polymorphism to specify population genetic structure of *Engraulis encrasicolus* (Pisces: Engraulidae) in the Black and Azov Seas. *Mors'kiy ekologichnyy zhurnal [Marine Ecological Journal]*, 2013, vol. 12, no. 4, pp. 45–52.
  9. Vodyasova E.A., Abramson N.I. Filogeografiya evropeyskogo anchousa *Engraulis encrasicolus* [Phylogeography of European anchovy *Engraulis encrasicolus*]. In: *Morskie biologicheskie issledovaniya: dostizheniya i perspektivy : materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem (g. Sevastopol', 19–24 sentyabrya 2016 g.) [Marine biological research: achievements and perspectives. Proceedings of the All-Russian Research and Practice Conference with International Participation (Sevastopol, 19–24 September, 2016)]*. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika [ECOSY-Hydrophysics], 2016, vol. 1, pp. 381–384. (In Russian).
  10. Magoulas A., Tsimenides N., Zouros E. Mitochondrial DNA phylogeny and the reconstruction of the population history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Molecular Biology and Evolution*, 1996, vol. 13, issue 1, pp. 178–190. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025554.
  11. Keskin E., Atar H.H. Genetic structuring of European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) population through mitochondrial DNA sequences. *Mitochondrial DNA*, 2012, vol. 23, issue 2, pp. 62–69. doi: 10.3109/19401736.2011.653798.
  12. Silva G., Lima F.P., Martel P., Castilho R. Thermal adaptation and clinal mitochondrial DNA variation of European anchovy. *Proceeding of the Royal Society B (Biological Sciences)*, 2014, vol. 281, issue 1792, pp. 1–9. doi: 10.1098/rspb.2014.1093.
  13. Zarraonaindia I., Pardo M.A., Iriondo M., Manzano C., Estonba A. Microsatellite variability in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) calls for further investigation of its genetic structure and biogeography. *ICES Journal of Marine Science*, 2009, vol. 66, issue 10, pp. 2176–2182. doi: 10.1093/icesjms/fsp187.
  14. Ruggeri P., Splendiani A., Occhipinti G., Fioravanti T., Santojanni A., Leonori I., De Felice A., Arneri E., Procaccini G., Catanese G., Ticina V., Bonanno A., Cerioni P.N., Giovannotti M., Grant W.S., Barucchi V.C. Biocomplexity in populations of European anchovy in the Adriatic Sea. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, issue 4, e0153061. doi: 10.1371/journal.pone.0153061.
  15. Vodyasova E.A. Novyy morfologicheskyy kriteriy dlya analiza neodnorodnykh skopleniy khamsy [New morphological criteria for analysis of heterogenic herds of anchovy]. *Naukovi zapiski Ternopil's'kogo natsional'nogo pedagogichnogo universitetu imeni Volodimira Gnatyuka. Seriya: Biologiya [Scientific Issues Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University. Series: Biology]*, 2013, vol. 3, no. 56, pp. 38–42. (In Russian).
  16. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 1997, vol. 25, no. 22, pp. 4692–4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692.
  17. Ivanova P.P., Dobrovlov I.S. Population – genetic structure on European anchovy (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) (Osteichthyes: Engraulidae) from Mediterranean Basin and Atlantic Ocean. *Acta Adriatica*, 2006, vol. 47, no. 1, pp. 13–22.
  18. Pakaki V., Magoulas A., Kasapidis P. New polymorphic microsatellite loci for population studies in the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.). *Molecular Ecology Resources*, 2009, vol. 9, issue 5, pp. 1406–1409. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02681.x.
  19. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 2006, vol. 6, issue 1, pp. 288–295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
  20. Raymond M., Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 1995, vol. 86, issue 3, pp. 248–249. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.
  21. Chapuis M.-P., Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, vol. 24, no. 3, pp. 621–631. doi: 10.1093/molbev/msl191.
  22. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, vol. 155, issue 2, pp. 945–959.
  23. Earl D.A., Von Holdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 2012, vol. 4, issue 2, pp. 359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
  24. Cornuet J.M., Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 1996, vol. 144, issue 4, pp. 2001–2014.
  25. Tuncay S.S., Bardakci F. Population genetics of European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the seas of Turkey based on microsatellite DNA. *Frontiers in Marine Science*, 2014, vol. 1. doi: 10.3389/conf.FMARS.2014.02.00154.
  26. Skazkina E.P. Razlichie azovskoy i chernomorskoy khamsy (*Engraulis encrasicolus maeoticus* Puzanov, *Engraulis encrasicolus ponticus* Aleks.) po otolitam [Distinguishing Azov anchovy *Engraulis encrasicolus maeoticus* Pusanov from the Black Sea anchovy *Engraulis encrasicolus ponticus* Alexandrov by otoliths].

- Voprosy ikhtiologii [Problems of Ichthyology]*, 1965, vol. 5, no. 4, pp. 600–605. (In Russian).
27. Karahan A., Borsa P., Gucu A.C., Kandemir I., Ozkan E., Orek A.Y., Acan S.C., Koban E., Togan I. Geometric morphometrics, Fourier analysis of otolith shape, and nuclear-DNA markers distinguish two anchovy species (*Engraulis* spp.) in the Eastern Mediterranean Sea. *Fisheries Research*, 2014, vol. 159, pp. 45–55.
28. Zuev G.V. Vnutrividovaya differentsiatsiya i rasprostranenie evropeyskogo anchousa *Engraulis encrasicolus* (L.) (Pisces: Engraulidae) v Chernom i Azovskom moryakh [Intraspecific differentiation and distribution of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (L.) (Pisces: Engraulidae) in the Black Sea and the Sea of Azov]. *Mors'kiy Ekologichniy Zhurnal [Marine Ecological Journal]*, 2014, vol. 13, no. 3, pp. 19–31. (In Russian).

Поступила 01.10.2019

Принята к печати 01.11.2019