

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ  
ИМЕНИ А.О. КОВАЛЕВСКОГО РАН»

На правах рукописи

**ВОДЯСОВА**

**Екатерина Александровна**

**ВНУТРИВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ  
ЕВРОПЕЙСКОГО АНЧОУСА (*ENGRAULIS ENCRASICOLUS*)**

03.02.06

ихтиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Наталья Иосифовна Абрамсон

Севастополь

2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение</b> .....	4
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....	14
1.1. Внутривидовая дифференциация и систематика европейского анчоуса .....	14
1.1.1. Современное состояние вопроса о подвидовой таксономической категории.....	14
1.1.2. Вопросы внутривидовой систематики европейского анчоуса.....	16
1.2. Филогеография европейского анчоуса <i>Engraulis encrasicolus</i> .....	29
1.2.1. Характеристика объекта исследования .....	29
1.2.2. Генетическая изменчивость по ядерным и митохондриальным генам в Атлантике и Средиземноморье.....	32
1.2.3. Две митохондриальные линии у европейского анчоуса.....	35
1.3. Клинальная изменчивость митохондриальных генов у европейского анчоуса.....	38
<b>Глава 2. Материалы и методы</b> .....	41
2.1. Исследованный материал.....	41
2.2. Морфологический анализ.....	43
2.3. Генетические лабораторные методы.....	46
2.4. Филогенетический и популяционно-генетический анализы.....	48
2.5. Анализ влияния факторов среды на распределение филогрупп.....	50
2.6. Моделирование географического распространения гаплогрупп (ГИС моделирование).....	52
2.7. Статистические методы.....	53
<b>Глава 3. Результаты</b> .....	55
3.1. Внутривидовая структура европейского анчоуса в Азово-Черноморском регионе.....	55
3.1.1. Морфологические данные.....	55

3.1.2. Генетические данные.....	69
3.1.3. Анализ причин несоответствия генетической и морфологической изменчивости.....	87
3.2. Изменчивость митохондриальной ДНК на протяжении всего ареала европейского анчоуса.....	90
3.2.1. Распределение двух митохондриальных линий европейского анчоуса.....	90
3.2.2. Связь филогеографической структуры с гидрологическим режимом.....	92
3.2.3. Моделирование экологических ниш и географическое распространение европейского анчоуса.....	96
<b>Глава 4. Обсуждение.....</b>	<b>101</b>
4.1. О выделении подвидов европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне.....	101
4.2. Филогеография европейского анчоуса.....	108
4.3. Влияние климатических факторов на распределение митохондриальных линий в Азово-Черноморском регионе.....	116
<b>Заключение.....</b>	<b>124</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>126</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>127</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

С широким внедрением в практику зоологических и ботанических исследований молекулярно-генетических методов и развитием нового направления, филогеографии [Avice et al., 1987], возобновились споры о концепции подвида.

Помимо оценки морфологических отличий и географической изолированности мест размножения, появляется возможность применить филогенетический подход к внутривидовым формам. Многие авторы предлагают считать подвид невалидным в случае отсутствия его генетической специфичности [Шварц, 1980; Barrowclough, 1982; O'Brien, Mayr, 1991; Thorpe et al., 1991; Пантелеев, 1992; Пантелеев, 2000; Avice, 2000]. В связи с этим назревает необходимость подтвердить целесообразность выделенных ранее подвидов с использованием молекулярно-генетических критериев, что восстановит таксономическую значимость данной категории [Zink, 2004; Винарский, 2015].

Молекулярно-генетические подходы позволяют не только установить генетическую дифференциацию (или гомогенность) и уточнить вопросы внутривидовой таксономии (совместно со стандартными морфологическими критериями), но и позволяют провести реконструкцию демографических колебаний популяций видов во времени, историю расселения и дивергенции [Avice et al., 1987; Avice, 2000; Blier, Lemieux, 2001; William et al., 2004; Galtier et al., 2009; Quintela et al., 2014]. Эти вопросы особенно актуальны в случае широкоареальных и мигрирующих видов, со сложной историей освоения современного ареала, периодически возникающей изоляцией между популяциями и спорной внутривидовой структурой.

Одним из таких видов является европейский анчоус *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758), который относится к массовым пелагическим промысловым рыбам, обладает высокой толерантностью к большим колебаниям температуры воды (6—22 °C) и солёности (5—41 ‰), благодаря чему имеет очень широкую

область распространения. Обитает в восточной Атлантике от южного мыса Африки до берегов Южной Норвегии, во всех районах Средиземного, Чёрного и Азовского морей [Whitehead et al., 1988]. Данный вид характеризуется высокой воспроизводительной способностью и быстрой сменой поколений, во время ежегодных сезонных миграций часто образует смешанные нерестовые и зимовальные скопления [Garcia, Palomera, 1996; Lisovento, Andrianov, 1996; Dulcic, 1997; Воґја et al., 1998]. Отсутствие полной изоляции между популяциями анчоуса и активные миграции приводят к постоянному обмену генами. Анчоус способен совершать миграции на очень большие расстояния. Последние исследования свидетельствуют о том, что ареал европейского анчоуса расширился до северо-западного района Атлантического океана. Все это привело к формированию сложной внутривидовой структуры, которая вызывает много вопросов. В разное время в пределах обширного ареала был описан ряд таксонов видового и подвидового ранга, позднее сведенных в синонимы *E. encrasicolus*. Среди этих номинальных таксонов наибольшее признание получили географически обособленные популяционные группировки, рассматриваемые ранее в ранге подвидов: атлантическая, средиземноморская, черноморская и азовская [Fricke et al., 2019].

Черноморская и азовская формы были описаны как подвиды на основании морфологических данных: *Engraulis encrasicolus ponticus* Aleksandrov, 1927 (черноморский анчоус) и *Engraulis encrasicolus maeoticus* Puzanov, 1923 (азовский анчоус) [Пузанов, Цееб, 1926; Александров, 1927; Световидов, 1964]. Их подвидовой статус признается не всеми [Калнина, Калнин, 1985; Chashchin, 1996; Зуев, 2014; Парин и др., 2014]. В тоже время, морфологическая изменчивость характерна и для популяций анчоуса в Атлантическом и Средиземноморском бассейнах, однако, в данных регионах подвиды в настоящее время не выделяют. В этой связи несомненное значение имеет оценка обоснованности продолжающегося выделения азовского и черноморского подвидов [Ninua, Japoshvili, 2008; Дирипаско и др., 2011 и др.] с помощью генетических маркеров.

Исследования генетической структуры, основанные на анализе изменчивости митохондриальной ДНК [Magoulas et al., 1996; Grant, 2005; Vinas et al., 2014] показали, что, несмотря на наличие частичной изоляции (Атлантический океан, Средиземноморское, Черное и Азовское моря разделены проливами с однонаправленными течениями, которые препятствуют свободной миграции рыб из одного бассейна в другой), выделенные формы анчоуса не имеют выраженной генетической дифференциации. Две выявленные митохондриальные филогруппы не обнаруживают строгой географической привязки и представлены практически во всех морях [Borrell et al., 2012; Silva et al., 2014; Vinas et al., 2014; Oueslati et al., 2014; Ouazzani et al., 2015; Pappalardo et al., 2015; Castilho, Silva, 2016]. На основе полученных данных был сделан вывод [Borsa, 2002] о присутствии в Средиземноморье двух репродуктивно изолированных криптических видов: океаническая форма (собственно *E. encrasicolus*) и прибрежная, описанная как самостоятельный вид *E. albidus* Borsa, Collet et Durand, 2005. При этом все упомянутые исследования не охватывают весь ареал европейского анчоуса: Азовское и Черное моря остались практически не изученными с использованием современных молекулярно-генетических методов. Данный регион отличается от оставшейся части ареала по гидрологическим параметрам и является достаточно изолированным, поэтому отсутствие данных о генетической изменчивости митохондриальной ДНК азовско-черноморского анчоуса является серьезным пробелом.

Вопросы истории расселения европейского анчоуса и формирование его современного ареала слабо изучены. Открытие пролива Гибралтар около 5 млн лет назад и последующие глобальные изменения в плейстоцене, сопровождающиеся периодическими закрытиями и открытиями проливов Босфор и Дарданеллы, изменениями уровня морей и сильными колебаниями климатических условий, связанных с ледниковыми периодами [Degens, Ross, 1972; Hsu, 1978; Hsu et al., 1978; Velichko, 1984; Aksu et al., 2002] – факторы, оказывавшие сильнейшее влияние на формирование ареала данного вида. Отсутствие палеонтологических данных не позволяет судить о временных промежутках появления и обитания

анчоуса в различных точках бассейнов. Однако, эти изменения, в свою очередь, оставили свой след в современной генетической внутривидовой структуре [Hsu et al., 1973; Vacescu et al., 1985; Selli et al., 1985; Tortonese et al., 1985].

Таким образом, на сегодняшний день осталась неизученной генетическая изменчивость европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне, остается спорным выделение азовского и черноморского подвидов анчоуса, неясен характер филогенетических отношений данного анчоуса с анчоусами Средиземного моря и Атлантики. В то же время вопрос о таксономическом статусе внутривидовых форм для данного промыслового вида рыб особенно актуален, так как связан с определением различных квот вылова для каждого подвида. Поэтому анализ генетической дифференциации европейского анчоуса в азово-черноморском бассейне, сопоставление морфологической и генетической изменчивости с целью выяснения внутривидовой структуры имеет не только теоретическое, но и практическое значение.

### **Степень разработанности темы исследования**

За последние 25 лет было проведено множество исследований по изучению изменчивости митохондриальной ДНК европейского анчоуса [Borsa, 2002; Ouazzani et al., 2015]. Также были выполнены работы на основе анализа ядерных генов (микросателлитные локусы) [Pakaki et al., 2009; Borrell et al., 2012 и др.]. Однако все исследования проводились только для особей из Атлантического океана и Средиземного моря; Азово-Черноморский регион охвачен почти не был. Таким образом, молекулярно-генетические данные были получены не на всем ареале, что делает проведенный ранее филогенетический анализ неполноценным.

В Черном и Азовском морях исследования двух подвидов *Engraulis encrasicolus ponticus* и *Engraulis encrasicolus maeoticus* базировались на морфологических и биохимических данных [Алтухов, 1969; Алтухов и др., 1969; Лиманский, Паюсова, 1969; Доброволов, 1978; Калнин, Калнина, Дашкова, 1984; Ivanova, Dobrovolo, 2006; Зуев, 2014]. Были изучены меристические и морфометрические признаки, оценивалась степень зараженности паразитами,

проводился анализ белкового полиморфизма. В результате в настоящее время для идентификации азовской и черноморской хамсы используется только один морфологический критерий – индекс отолитов [Сказкина, 1965]. Молекулярно-генетические методы в изучении дифференциации и генеалогии данных подвидов ранее не применялись. Необходимо восполнить данный пробел, чему и посвящена настоящая работа.

### **Цель и задачи работы**

Цель настоящей работы - оценить внутривидовую изменчивость и дифференциацию локальных группировок анчоуса в Азово-Черноморском регионе и выяснить их филогенетические и таксономические отношения с анчоусами Средиземного моря и Атлантики.

В соответствии с заявленной выше целью работы необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить внутривидовую изменчивость и дифференциацию азовского и черноморского анчоуса на основе митохондриального гена *cytb* и микросателлитных локусов ядерной ДНК.
2. Проанализировать морфологическую изменчивость азовского и черноморского анчоуса в контексте гидрологических условий их нереста.
3. Сопоставив морфологическую и генетическую изменчивость дать оценку обоснованности выделения азовского и черноморского подвидов.
4. Провести филогеографический анализ европейского анчоуса на всем ареале вида, реконструировать наиболее вероятную историю расселения вида в Азово-Черноморском бассейне и дать оценку филогенетических отношений азово-черноморского анчоуса и анчоуса Средиземного моря и Атлантики.
5. Изучить распределение митохондриальных гаплогрупп анчоуса по ареалу в контексте влияния различных климатических факторов.

### **Научная новизна**

Впервые проведен анализ изменчивости митохондриального гена *cytb* у европейского анчоуса в Черноморском и Азовском бассейнах; полученные данные сопоставлены с его изменчивостью в других частях ареала. Проанализировано влияние условий среды обитания (температура, соленость, содержание кислорода, концентрация нитратов и фосфатов) на географическое распределение двух филогрупп, выявленных на основе митохондриальной ДНК. Предложена модель исторического расселения европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне. Разработан новый морфологический критерий для идентификации азовского и черноморского анчоуса. Проведен комплексный анализ дифференциации популяций анчоуса из Черного и Азовского морей с учетом изменчивости морфологических и генетических маркеров (параметры отолитов, фрагмент митохондриального гена *cytb*, ядерные микросателлитные локусы). На основе генетического анализа предлагается рассматривать азовского и черноморского анчоуса как экологические морфы, а не подвиды.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическое значение работы заключается в выявлении связи климатических флуктуаций и изменчивости митохондриальной ДНК и влияния условий среды обитания на расселение двух филогенетических линий европейского анчоуса. Эти результаты могут быть использованы для анализа схожих по биологии других видов морских пелагических рыб. Показано, что такие морфологические характеристики, как параметры отолитов, широко используемые в систематике ныне живущих и ископаемых рыб, существенно зависят от условий среды обитания: климатические факторы, кормовая база и др.; наблюдаемые различия в строении отолитов могут быть примером влияния внешних факторов на морфологическую изменчивость в рамках одного вида. На основе данных по генетическим маркерам (*cytb* и микросателлитные локусы) показано, что характерные для многих массовых пелагических рыб активные миграции и отсутствие изоляции, являются причиной генетической однородности их

популяций. В электронную базу данных Генбанк были помещены нуклеотидные последовательности фрагмента митохондриального гена *cytb* европейского анчоуса из Черного и Азовского морей. Разработанный морфологический критерий (угол отолита), может быть использован в рыболовном промысле для определения азовской и черноморской морф анчоуса, что необходимо для контроля и рационального использования биологических ресурсов.

### **Методология и методы исследования**

Настоящая работа базируется на комплексном подходе, сочетающем современные молекулярно-генетические и классические морфологические методы:

1. Первичная обработка материала: определение вида, проведение замеров стандартной длины тела, получение отолитов и просветление их в глицерине, фиксация тканей 96% этанолом).

2. Лабораторная обработка: проведение замеров параметров отолита под микроскопом, выделение геномной ДНК, амплификация фрагмента митохондриального гена *cytb* и микросателлитных локусов, проверка продуктов ПЦР с помощью электрофореза в агарозном и полиакриламидном гелях, очистка ПЦР продуктов, секвенирование и фрагментный анализ.

3. Морфологические методы: определение возраста рыбы на основе анализа отолитов, морфометрический анализ параметров отолита.

4. Молекулярно-филогенетические методы: выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей, построение филогенетических деревьев и сетей, демографический анализ, оценка уровня гибридизации между популяциями.

5. Статистический анализ: оценка нормальности с помощью различных критериев, непараметрические методы корреляционного и дисперсионного (ANOVA Фридмана и Крускала-Уоллиса) анализа, дискриминантный многофакторный анализ.

6. Методы ГИС моделирования: для тестирования различных моделей распространения клад А и В по данным частоты встречаемости характерных

гаплотипов и гидрологическим характеристикам (температура, соленость, рельеф дна) использовалась программа MaxEnt.

### **Положения выносимые на защиту**

1. Черноморского и азовского анчоуса следует считать экологическими морфами, а не подвидами.
2. Популяции европейского анчоуса на всем ареале характеризуются слабой генетической дифференциацией.
3. На географическое распределение двух митохондриальных линий европейского анчоуса оказывает влияние сочетание таких факторов, как соленость и температура.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов работы обеспечивается применением адекватных современных методов генетических исследований, морфологических методов, ранее опробованных на данной группе рыб, использованием репрезентативных для исследования проб и адекватных современных методов статистического анализа и моделирования. Материалы диссертации были представлены на 13 международных и всероссийских конференциях и совещаниях: Международная конференция «Водные биоресурсы и аквакультура» (Киев, 2010), Международные конференции «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» в 2011 и 2016 годах (Санкт-Петербург), Международные конференции «Современные проблемы теоретической и практической ихтиологии» в 2012 и 2013 годах (Черновцы, Украина и Тернополь, Украина), Международные конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» в 2012 и 2013 годах (Севастополь), Международная конференция «Современные проблемы физики, химии и биологии» (Севастополь, 2012), Международная конференция молодых ученых «Понт Эвксинский» (Севастополь, 2013), Международная молодежная научная конференция «Популяционная экология растений и животных» (Уфа, 2015), Международная конференция молодых ученых «Pontus

Euxinus 2015» (Севастополь, 2015), The Regional Workshop «Black Sea Marine Ecosystems and Fisheries» (Трабзон, Турция, 2015), Всероссийская конференция с международным участием «Морские биологические исследования: достижения и перспективы» (Севастополь, 2016).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 6 – статей в рецензируемых изданиях, 13 – в материалах конференции.

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, 4 глав (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение), заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 151 странице, содержит 17 таблиц и 35 рисунков. Библиографический список содержит 240 источников, в том числе 91 на русском языке.

### **Благодарности**

Я выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю к.б.н., зав. лаб. молекулярной систематики ЗИН РАН Абрамсон Наталье Иосифовне за огромную поддержку, необходимые консультации и советы, а также всестороннюю помощь на всех этапах работы над диссертацией.

Я благодарна д.б.н., зав. отд. физиологии животных и биохимии ФИЦ ИнБЮМ Солдатову Александру Александровичу за помощь в проведении исследований и содействие в организации научных стажировок в различные научно-исследовательские институты.

Выражаю признательность проф., д.б.н., член. корр. НАН Украины Шульману Георгию Евгеньевичу за предложенный объект исследования и постоянное содействие.

Огромное спасибо зав. лабораторией ихтиологии ЗИН РАН А.В. Балускину, зав. отделом ихтиологии ФИЦ ИнБЮМ Г.В. Зуеву, зав. лабораторией

генетических исследований ФГБНУ «АзНИИРХ» Н.А. Небесихиной, сотрудникам лаборатории молекулярной систематики ЗИН РАН С.Ю. Бодрову, О.В. Бондаревой, Е. А. Генельт-Яновскому и Т.В. Петровой, сотруднику отдела физиологии и биохимии ФГБУН ИМБИ М. В. Чесалину, всем сотрудникам лаборатории молекулярной генетики ВНИРО и зав. Н.С. Мюге за помощь в освоении различных методов, ценные советы и проявленное внимание к моей работе.

Я глубоко благодарна коллегам, предоставившим материал для исследования: Т.В. Юневой и В.Н. Никольскому (ФГБУН ИМБИ), А.К. Чашину (Керченский филиал ФГБНУ «АзНИИРХ»), Н.А. Небесихиной (ФГБНУ «АзНИИРХ»).

Кроме того, выражаю огромную признательность всей своей семье, за понимание, терпение и поддержку, в процессе подготовки диссертации.

Работа выполнена в рамках темы № 1001-2014-0014 «Мониторинг биологического разнообразия гидробионтов Черноморско-Азовского бассейна и разработка эффективных мер по его сохранению».

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Внутривидовая дифференциация и систематика европейского анчоуса

#### 1.1.1. Современное состояние вопроса о подвидовой таксономической категории

Как известно, вид является основной таксономической единицей, подвид же представляет собой вспомогательную таксономическую категорию, которая отражает таксономию в случае сложной внутривидовой структуры. Майр давал несколько определений подвида: «...географически локализованное подразделение вида, которое генетически и систематически отличается от других подразделений...» [Майр, 1947, с. 172]; «...совокупность фенотипически сходных популяций некоторого вида, населяющих часть ареала этого вида и таксономически отличных от других популяций того же вида...» [Майр, 1971, с.57]. Таким образом, основными характерными чертами подвидов являются некие таксономические отличия (диагностические морфологические признаки, генетические отличия) и географическая обособленность.

Четких критериев для выделения подвидов разработано не было, и многими исследователями отмечается, что сильных различий между таксономической категорией «подвид» и не таксономической «географическая раса» нет [Винарский, 2015]. В настоящее время существует единственное правило 75%: популяцию можно считать подвидом, если 75 процентов составляющих ее особей отличаются от всех (97%) особей ранее выделенного подвида [Amadon, 1949]. Однако данное правило не решило проблему, и с введением подвида как низшей таксономической категории в Международный кодекс зоологической номенклатуры [МКЗН, 2004] статус подвида стал присваиваться огромному количеству популяций, тем самым порождая путаницу в виде «фантомных

подвидов», мнимую политипичность видов и уменьшая таксономическую значимость данной категории [Zink, 2004; Винарский, 2015].

С развитием филогенетической концепции вида, категория подвида претерпевает кризис: здесь нет места данной категории (как и в других проектах безранговой таксономии). С другой стороны, появление молекулярно-генетических методов дало дополнительный инструмент для выделения подвидов. Так многие авторы говорят о необходимости генетической дифференциации между подвидами по ядерным или митохондриальным маркерам [Шварц, 1980; Barrowclough, 1982; O'Brien, Mayr, 1991; Thorpe et al., 1991, Пантелеев, 1992; Avise, 2000; Пантелеев, 2000; Винарский, 2015]. При этом подвиды могут иметь гораздо более низкую генетическую дистанцию, чем между видами этого рода. Например, виды сем. Lymnaeidae (пресноводные моллюски) имеют уровень дивергенции от 8,3% до 15,3%, а их подвиды всего 2% [Vinarski et al., 2012]. В тоже время, каких-либо диапазонов генетических дистанций не существует, и каждый случай следует рассматривать отдельно. Дополнительная сложность заключается в асинхронности темпов дивергенции фенотипических и генотипических признаков, а также в наличии географической изменчивости. Морфологическая изменчивость, которая находится в рамках нормы реакции на среду обитания, лежит в основе выделения географических рас, и грань с подвидом тут достаточно тонкая.

Суммируя вышесказанное, можно выделить три характеристики подвида: наличие наследственных закрепленных различий по нескольким независимым признакам, аллопатрический или парапатрический тип распространения (географическая подразделенность) и филогенетическая обособленность (генетическая дивергенция с возможным потоком генов между подвидами). Для восстановления таксономической значимости данной категории и «чистки» подвидов необходимо пересматривать обоснованность выделенных подвидов на основе фенотипических признаков с использованием генетических маркеров.

### 1.1.2. Вопросы внутривидовой систематики европейского анчоуса

Европейский анчоус *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) (или хамса) один из видов, для которых проблема целесообразности выделения подвидов стоит достаточно остро в силу сложной внутривидовой структуры и их огромного значения для промысла [Ivanov Beverton, 1985; Kocatas et al., 1993; Зуев и др., 2001; Чесалин и др., 2001; Зуев и др., 2010].

Европейский анчоус относится к семейству Engraulidae (род *Engraulis* Cuvier), в котором известно 16 родов и около 140 видов, обитающих в тропических и субтропических морях [Нельсон, 2009]. Благодаря толерантности к большим колебаниям температуры воды (6 – 28 °С) и солёности (5—41 ‰), европейский анчоус имеет очень широкую область распространения. Обитает в восточной Атлантике от Канарских островов и Марокко до Бискайского залива, во всех районах Средиземного и Чёрного морей; в летнее время заходит в Северное (до берегов Южной Норвегии), Балтийское и Азовское моря. Очень редко, но встречается в Индийском океане у берегов Сомали [Whitehead et al., 1988]. Основной ареал *E. encrasicolus* представлен на Рисунке 1.

В пределах обширного ареала у европейского анчоуса обычно выделяют несколько обособленных форм: атлантическую, средиземноморскую, черноморскую и азовскую [Александров, 1927]. Все эти формы населяют частично изолированные, за счет проливов Гибралтар и Босфор, бассейны. Анчоуса Атлантического океана и Средиземного моря в настоящее время не рассматривают в статусе разных подвидов. В тоже время, в Азово-Черноморском бассейне до сих пор многими авторами выделяются два подвида, описанные на основании морфологических различий: *Engraulis encrasicolus ponticus* Aleksandrov, 1927 и *Engraulis encrasicolus maeoticus* Puzanov, 1926. Данных на основе изменчивости нуклеотидных последовательностей ядерных или митохондриальных генов (локусов) в поддержку их выделения пока нет. Все молекулярно-генетические работы ограничивались анализом аллозимных маркеров. Рассмотрим данный вопрос более подробно.

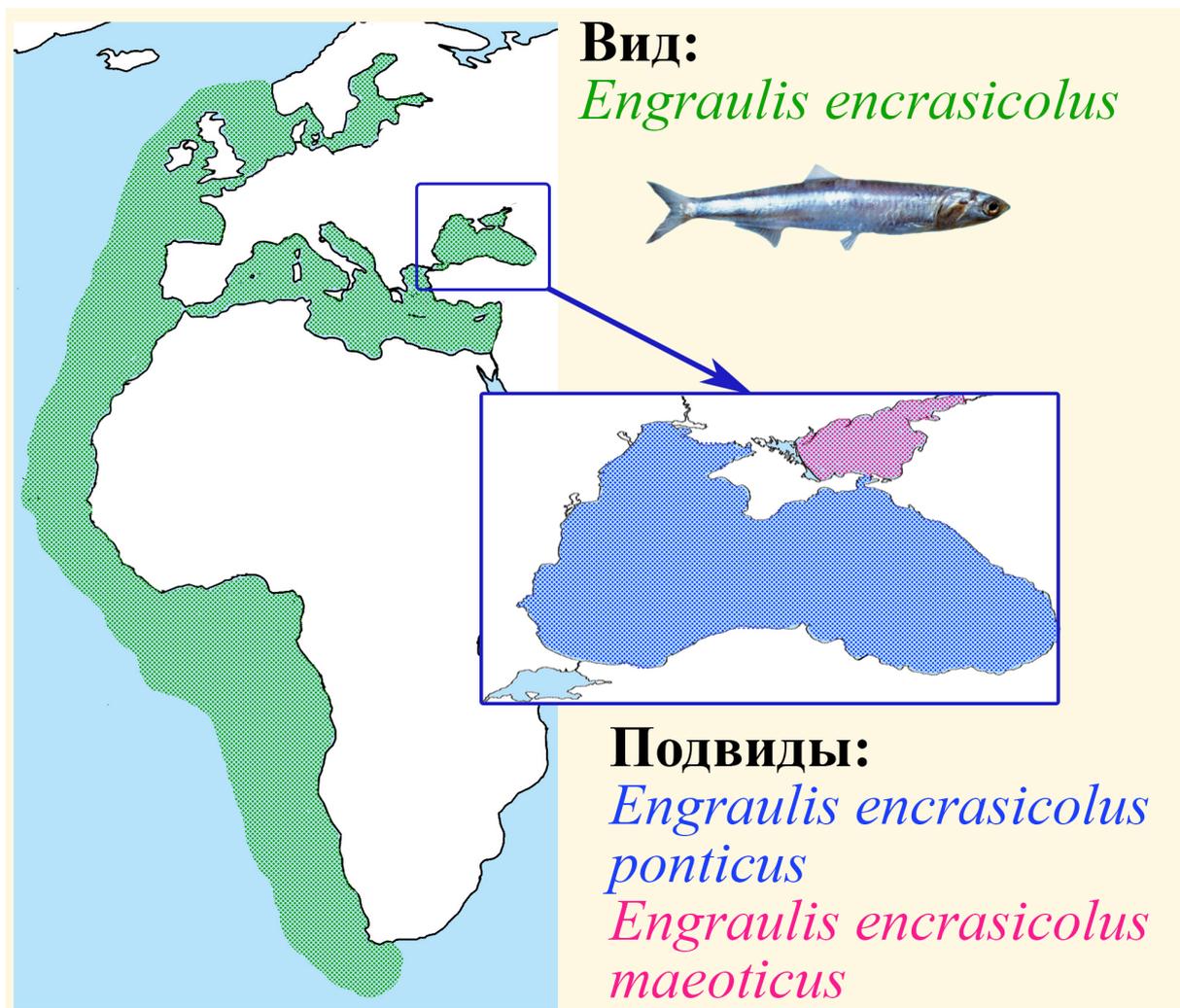


Рисунок 1 – Современный ареал *Engraulis encrasicolus*

Впервые обратил внимание на различие между азовской и черноморской хамсой Зернов [1904]. Данные формы отличались длиной тела, окраской спинки и консистенцией мяса. Именно тогда впервые заговорили о двух расах анчоуса, которые населяют Азовское и Черное моря. Позже расовыми отличиями анчоуса в Азово-черноморском бассейне занимался Тихий [Тихий, 1914, 1917]. Он считал, что принятые признаки отличия азовской и черноморской хамсы не являются надежными и полагал, что это не две географические расы, а представители разных возрастных групп. Это предположение позже было опровергнуто при изучении морфологической изменчивости на всем ареале.

Так, заметные различия были установлены между средиземноморской и черноморской формами, и еще более существенные между последней и азовской

[Пузанов, 1923, Пузанов, Цееб, 1926]. Этот автор объединил черноморского и средиземноморского анчоуса в один подвид *E.e. typicus*, а азовскую популяцию выделил в самостоятельный подвид: *E. e. maeoticus* [Пузанов, Цееб, 1926]. Критерием для выделения таксономических форм послужили как меристические (число позвонков, число жаберных тычинок), так и морфометрические признаки (антедорсальное и антевентральное расстояния), а также различия в темпе роста двух последних форм [Пузанов, Цееб, 1926]. В работе было отмечено, что, если анализировать хамсу двигаясь от Азовского моря до Атлантического океана, происходит постепенное увеличение размеров, увеличение числа позвонков и увеличение антедорсального расстояния. Именно на основе этих данных в результате был выделен подвид *E. e. maeoticus*.

В 1927 г. была проделана огромная работа по анализу морфологических признаков анчоусов Азовского и Черного морей и установлению диагностических различий [Александров, 1927]. Для сравнения были взяты 17 пластических признаков и 4 меристических: число лучей D, число тычинок жаберной дуги, число чешуй и число позвонков. Многочисленные морфологические различия были сведены к одному признаку – разнице в темпе роста передней части тела (и головы), с одной стороны, и хвостового отдела, с другой. При сопоставлении с другими анчоусами было показано, что азовский анчоус растет по типу средиземноморской расы, а рост черноморского очень близок к типу роста атлантической расы. Из меристических признаков наиболее значимым оказалось число позвонков ( $43,57 \pm 0,06$  для азовского анчоуса и  $44,62 \pm 0,05$  для черноморского). На основе морфологических отличий автор выделяет черноморский подвид *E. e. ponticus*.

Несмотря на дальнейшие дискуссии по поводу правомерности выделения подвидов анчоуса, в настоящее время многими ихтиологами признается существование двух подвидов в Азовском и Черном морях: *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus*. Ниже рассмотрены особенности каждого подвида [Световидов, 1964].

### *Черноморская хамса*

Размеры меньше, чем у атлантической и средиземноморской форм, но более крупные по сравнению с азовской. В среднем длина тела составляет 12 см (особи вырастают максимум до 18 – 20 см).

Черноморская хамса распространена по всему Черному морю. Выделяют несколько стад, которые заселяют определенные территории. Западное стадо обитает у берегов Одессы и Болгарии, на зимовку уходит к южным берегам Крыма; восточное стадо – зимует у берегов Грузии, в районе Новороссийска-Туапсе вместе с азовской хамсой и у восточного побережья Турции, весной нерестится в восточной половине моря [Маляцкий, 1934].

Придерживается в основном температуры 6 – 28 °С и солености от 7 ‰. Размножение и откорм происходит с мая по сентябрь. С началом похолодания начинает сбиваться в косяки и покидает мелководную и охлаждаемую северо-западную часть моря. В теплые зимы на глубину не уходит, только в случае охлаждения поверхностных вод ниже 7 °С опускается на глубину 70-80 м, где совершает суточные вертикальные миграции. Перед началом нереста косяки скапливаются в поверхностных водах и держатся в скоплениях. У берегов Грузии весенние миграции начинаются в конце марта – середине апреля и заканчиваются в мае. Западное стадо начинает мигрировать в мае, наиболее интенсивно в июне. Во время весенних миграций двигается вдоль берегов и, постепенно отходя от них, рассеивается для нереста и нагула, держась над слоем температурного скачка [Майорова, 1950; Майорова, Чугунова, 1954]. У берегов Болгарии появляется в мае-июне и октябре-ноябре [Максимов, 1913].

Размножение происходит в течение длительного времени, с мая, иногда с конца апреля, по сентябрь, наиболее интенсивно с июня по август. В прибрежной зоне раньше, чем в отдалении от берегов. В западной части моря нерест начинается позднее, чем в восточной. Наиболее массовый нерест происходит в местах массового развития планктона – по всей северо-западной части моря, у юго-восточных берегов Крыма, против Керченского пролива, вдоль берегов Кавказа и

более разреженно вдали от берегов. Икрометание начинается при температуре воды 15 – 17 °С, иногда 13 – 14 °С, массовый нерест происходит при 19 – 26 °С.

Вследствие большей по сравнению с азовской хамсой растянутости нереста в первый год жизни размеры варьируют от 35 до 105 мм, в то время как размеры азовской хамсы колеблются от 35 до 85 мм. В западной половине моря вследствие более быстрого роста в первый год жизни по сравнению с восточной частью, средний размер взрослых особей на 10 мм больше [Майорова, Чугунова, 1954].

Интенсивность питания в различные периоды жизни на протяжении года неодинакова. Максимальная интенсивность наблюдается летом, не прекращает усиленно питаться и во время нереста.

#### *Азовская хамса*

Размеры меньше черноморской хамсы, в среднем общая длина тела составляет 10 см, наибольшие достигают до 14 см, темп роста медленнее. Окраска спины светлее, кремово-желтая с более темными пятнами и полосками. Однако, при весенних миграциях из Черного моря и осенью из Сиваша окраска темнее (как у черноморской хамсы).

Распространена в восточной части Черного моря, у берегов Крыма до Севастополя, у Кавказа до Сухуми, иногда до Батуми, летом в Азовском море. Ежегодно заходит в Сиваш до Ворот, размножение происходит в Азовском море.

Биология сходна с биологией черноморской хамсы. Основное отличие в распространении в зимнее время и в период размножения, существуют и некоторые биологические особенности. Зимует у берегов Крыма (район Судака, Ялты, мыса Херсонес) и Кавказа (район Анапы, Новороссийска, Гагр). Ход на нерест через Керченский пролив обычно начинается в конце апреля, когда температура воды достигает 9 – 11 °С. В период нереста держится в юго-западном, западном и северо-восточном районах моря, преимущественно в прибрежных областях. Нерест менее продолжителен, чем у черноморской хамсы, происходит при солености 10 – 12 ‰, разгар при температуре воды 19 – 26 °С. Молодь начинает уходить из Азовского моря на зимовку со второй половины августа, в октябре уходит и взрослая хамса. Время массового выхода взрослой хамсы непостоянно год от года, и меняется под

действием различных факторов (температура, жирность). Обычно миграция начинается при 9 – 12 °С, но бывает и при более высокой температуре, и при более низкой. Начало миграции зависит от биологического состояния хамсы: упитанности, содержания жира в теле, гемоглобина. В годы низкой упитанности время пребывания хамсы в Азовском море увеличивается, начало миграции запаздывает и может произойти массовая гибель при резком падении температуры до 5 – 6 °С (такое наблюдалось в 1919, 1934, 1953 гг.). Уменьшение упитанности связывают с ухудшением условий нагула после зарегулирования стока Дона, которое произошло в 1952 году. Содержание жира по сравнению с черноморской хамсой выше (до 30% во время осенних миграций в Черное море) [Тараненко, 1958].

Вопрос о таксономическом статусе азовского и черноморского анчоуса остается дискуссионным, выделение их в качестве таксонов подвидового ранга (а не популяций или рас) некоторыми ихтиологами ставилось под сомнение [Данилевский, 1960; Данилевский, Майорова, 1979; Dobrovolov, 1992]. Ниже мы приведем основные аргументы, которые позволяют усомниться в целесообразности выделения азовской и черноморской хамсы в подвиды.

#### *Перекрытие миграционных путей*

Первым существенным моментом является наличие широких зон симпатрии у азовского и черноморского анчоуса. Места зимовок у данных подвидов сильно перекрываются, что может приводить к перемешиванию косяков и появлению подвидов в нехарактерных для них местах нереста (например, черноморский анчоус может уходить вместе с азовской хамсой на нерест в Азовское море, о чем будет рассказано ниже). Рассмотрим особенности миграций данных подвидов и случаи их появления в различных точках Азово-Черноморского бассейна.

В зимние месяцы стаи анчоуса мигрируют в более теплые области Черного моря: к берегам Крыма, Кавказа, Анатолии и вероятно в прибосфорский район. У крымского побережья преимущественно зимует черноморская хамса, которая появляется здесь в ноябре-декабре по мере охлаждения температуры воды в северо-западной части Черного моря [Майорова, 1950; Майорова, Чугунова, 1954].

Черноморская хамса из западной и северо-западной части моря подходит к Севастополю в октябре. По данным Данилевского [Данилевский, 1964], анчоус из северо-западной части Черного моря мигрирует к южным берегам Крыма, а анчоус, обитающий в восточной части Черного моря, на зиму мигрирует к берегам Турции. Также у побережья Крыма зимует мелкая азовская хамса, которая в разные годы распространяется до мыса Сарыч и Севастополя и редко – до Евпатории, тогда как черноморская хамса встречается в этом районе с мая по октябрь-ноябрь [Максимов, 1913]. Черноморская хамса появляется у Севастополя в октябре при понижении температуры до  $14^{\circ}\text{C}$  и держится до  $9^{\circ}\text{C}$ , т.е. примерно до декабря. У Севастополя может появляться азовская хамса в январе – феврале и до марта – апреля [Зернов, 1913]. Большинство авторов сходятся во мнении, что у берегов Крыма зимует и азовская и черноморская хамса, однако по разным причинам миграция азовской хамсы происходит не ежегодно [Данилевский, 1958].

Данилевский Н.Н. и Камбуров Г.Г. в 1960-х годах зарегистрировали у южных берегов Крыма анчоуса, большая часть которого (80%), по данным анализа паразитофауны, происходит из северо-западной части Черного моря. В опресненных прибрежных водах Грузии был обнаружен анчоус, по степени зараженности личинками *Hysterothylacium aduncum* сходный с азовским [Данилевский, Камбуров, 1969].

Такие зимовальные миграции могут объясняться системой течений, циркулирующих в Черном море. Здесь существует два круговых течения. Первое, восточное несет теплую воду от анатолийских берегов вдоль Кавказа к Керченскому проливу, отсюда поворачивает, следуя конфигурации берегов Крыма к юго-западу. В районе Ялты течение отжимается к югу, пересекает Черное море и, меняя направление на юго-восточное, подходит к Анатолии у Синопа. Второй круговорот образует течение, спускающееся из северо-западной части моря вдоль берегов Румынии и Болгарии, до Босфора и затем идущее вдоль анатолийских берегов на восток до Эрегли, где поворачивает на север, пересекает море и у мыса Херсонес следует вдоль берега до Евпатории, поворачивает от Тарханкута на запад к устьям Дуная. Эти два течения, по-видимому, могут являться фактором,

изолирующим популяции анчоуса в Черном море. Однако эта изоляция не является непреодолимой для взрослых особей, что подтверждается частым попаданием черноморского анчоуса в Керченском проливе. В некоторые годы в стаде азовской хамсы была значительная примесь черноморской [Данилевский, 1960].

Представители обеих рас были обнаружены в восточной части моря, где встречались постоянно. Из-за неоднородности черноморской хамсы в Черном море, было предложено разделение на два племени: западное (зимовка у южного берега Крыма) и восточное (зимовка у берегов Грузии). Восточная хамса мельче западной и медленнее растет [Майорова, 1934].

Что касается смешанных скоплений около Севастополя, то тут единого мнения нет, и ситуация может меняться в зависимости от года. Часть азовской хамсы, зимовавшей у берегов Крыма, весной направляется не на восток в Азовское море, а на запад, проникая в северо-западную часть Черного моря, где, как было принято, размножается черноморский анчоус [Виноградов, 1956]. Тут повторяется ситуация аналогичная проникновению черноморской хамсы в район нереста азовской.

Согласно Пузанову, осенние уловы в Севастополе представлены черноморской хамсой, а зимние и весенние - двумя подвидами. Он выделил так называемую «севастопольскую популяцию», сходную по ряду морфологических свойств с азовской, ее часто также называют прибрежной [Пузанов, 1936, 1957]. В северо-западной части Черного моря он изучал местную популяцию хамсы, по ряду морфологических признаков близкую к азовскому подвиду (назвал одесской) [Пузанов, Цееб, 1926].

Такие факты смешения двух подвигов в местах нереста (появление двух рас в северо-западной части Черного моря, проникновение черноморского анчоуса через Керченский пролив в Азов) уже ставят под сомнение целесообразность придания азовской и черноморской хамсе таксономического статуса, так как понятие подвида изначально предполагает географическую изоляцию в местах нереста.

*Противоречия и сложности в идентификации подвидов на основе различных методов*

После того, как Александровым и Пузановым на основе нескольких морфологических характеристик были выделены данные подвиды, последующие работы были направлены на поиск дополнительных признаков.

После проведения морфологических исследований двух подвидов Сказкиной [Сказкина, 1965] в качестве основного (и достаточного) диагностического признака был предложен индекс отолитов. Это соотношение длины отолита и его ширины было выбрано на основании сильных различий отолитов у азовской и черноморской хамсы. Различия в форме отолитов отмечались многими исследователями, было показано, что она практически не зависит от возраста рыбы и слабо коррелирует с длиной тела. Данный морфологический критерий активно используется и в настоящее время, так как его измерение происходит параллельно с определением возраста [Майорова, 1939].

Были также применены овоцито-паразитологические методы и показаны различия по степени зараженности личинками *H. aduncum* между азовской и черноморской хамсой. Однако сами авторы сделали вывод, что, возможно, степень зараженности зависит от солености [Данилевский, Камбуров, 1969]. Из географических точек со схожими условиями по солености воды наблюдалась одинаковая степень зараженности паразитами. В данном случае соленость может являться фактором, влияющим на жизнедеятельность трематод, в результате чего и наблюдаются различия между подвидами хамсы. Авторами были выделены 4 стада анчоуса. Западное солоноводное стадо и восточное солоноводное стадо, населяющие открытые районы Черного моря; северо-западное стадо, населяющее опресненные прибрежные воды западной части Черного моря и азовское стадо, которое обитает в Азовском море и прибрежных водах вдоль кавказского побережья Черного моря.

В 60-х годах впервые Алтуховым Ю.П. путем исследования частот групп крови был проведен иммуногенетический анализ внутривидовой дифференциации анчоуса из Черного и Азовского морей [Алтухов, 1969]. Результаты исследования

показали различия между азовской и черноморской хамсой по этим показателям. Алтухов отмечает сильную гетерогенность азовской хамсы и выделяет три субпопуляции: собственно азовскую, гибриды азовской и черноморской и черноморскую, которая вероятно проникает в зоны нереста и нагула азовской хамсы и смешивается с последней. Была предложена модель внутривидовой структуры: в Азовском и Черном морях обитает один вид анчоуса *E. encrasicolus*, который представлен тремя расами (азовская, черноморская и смешанная) с большим количеством элементарных популяций.

Позже была проведена работа, где оценивалась степень зараженности личинками трематод, были использованы различия в скорости роста, частот групп крови и аллелей изоцитратдегидрогеназы и эстеразы [Чащин, Акселев, 1990]. Чащин указывает, ссылаясь на результаты собственных исследований (1975-1988), что среди зимовавшей на ЮБК в 1976-1988 гг. хамсы не удавалось обнаружить черноморскую популяцию. Таким образом, по его мнению, данные, приводимые Данилевским и Майоровой [Данилевский, Камбуров, 1969; Майорова, 1934], являются ошибочными из-за неправильного определения расовой принадлежности анчоуса. Здесь мы уже наблюдаем проблему сложности определения подвидов с использованием нескольких морфологических критериев, предложенных ранее. Такая несогласованность может свидетельствовать о более сложной внутривидовой структуре в данном регионе.

В летних пробах в 1980, 1982 и 1987 гг. Чащиным обнаружена азовская хамса в Одесском и Каркинитском заливах. В Одесском заливе хамса азовской расы оказалась по своим генетическим характеристикам более «азовской» по сравнению с хамсой из Азовского моря. Это связали с менее масштабными экологическими изменениями данного региона по сравнению с Азовским морем, которые произошли там в 1970-х годах, когда зарегулирование стока рек Дона и Кубани привело к повышению солености воды [Чащин, 1990; Тевяшова, 1998]. Тут следует обратить внимание, что само такое объяснение противоречит определению подвида, как таксономической категории, морфологические особенности которой отличаются определенным постоянством во времени и пространстве [Шварц,

1980]. Возникает закономерный вопрос: правомерно ли использовать категорию подвид, если зарегулирование рек за 20 лет приводит к такому уменьшению различий между хамсой из Азовского и Черного морей, что хамсу из северо-западной части Черного моря начинают называть «более азовской»?

Чащиным был предложен комплексный метод расовой детерминации, основанный на генетических, овоцито-паразитологических и морфологических особенностях для выявления схемы распространения и миграции азовского и черноморского анчоуса [Chashchin, 1996]. Однако, для экспресс-определения состава скоплений хамсы такой комплексный метод, в отличие от метода, основанного на индексе отолитов, не получил распространения.

Согласно результатам различных исследований, для каждого из подвидов было показано наличие пространственно-обособленных репродуктивных, нагульных и зимовальных областей [Dobrovoloov, 1976; Ivanova, Dobrovoloov, 2006], биохимический метод подтвердил, что азовский анчоус единично появляется около болгарского побережья [Dobrovoloov, 1992]. Азовская хамса была обнаружена у берегов Болгарии в 1979, 1982, 1988, 1994 и 1997 гг. Возможно азовская хамса распространяется вдоль западного побережья на юг до 43 °с.ш. [Доброволов, 1988; Vat et al., 2007; Ivanova et al., 2013]. Подтверждены постоянные заходы атлантического анчоуса в Черное море [Доброволов, 1980].

Электрофоретический спектр на основе биохимических маркеров (мышечный миоген, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, НАД-зависимая декарбоксилирующая малатдегидрогеназа, фосфоглюкомутаза, 6-фосфоглюконат дегидрогеназа, супероксиддисмутаза) для черноморского анчоуса показал его сходство с европейским анчоусом из всех регионов [Dobrovoloov, 1992], что противоречит морфологическим исследованиям Александра [1927].

В 1980-х годах в результате популяционно-генетических исследований В.В. и О.В. Калнинами были выделены четыре группировки анчоуса, различные по подвидовому составу: азовская, черноморская, азово-черноморский гибрид и гибрид черноморской хамсы предположительно со средиземноморской [Калнин и др., 1984; Калнина, Калнин, 1984; Калнин, Калнина, 1985]. О гибридизации анчоуса

упоминал и Чащин. По его данным, происходит уменьшение различий между подвидами по частотам групп крови, которое было установлено в 1978-1981 гг. [Чащин, 1982], что свидетельствует о гибридизации азовской и черноморской хамсы.

В работе Зуева [Зуев, Мурзин, 2009] в качестве диагностического внутривидового признака для хамсы использовали величину индекса отолитов ( $l/d$ ). Анализировалась хамса, выловленная в осенне-зимний сезон 2008/2009 гг. у побережья Крыма от м. Лукул до м. Аю-Даг. С помощью метода вероятностной бумаги были выделены три группировки хамсы: азовская, черноморская, принадлежность третьей группы остается неясной. Предполагают, что это черноморская хамса, размножающаяся в южной части моря, либо представители средиземноморской (мраморноморской) популяцией.

В последующей работе Зуева [2014] предложена следующая внутривидовая структура европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне, по которой выделяют два подвида (азовский и черноморский) со сложной популяционной структурой. Так для азовского выделена восточная (Азовское море) и западная (северо-западная часть Черного моря) популяции. Черноморский анчоус, согласно предложенному подразделению, имеет три популяции: западная, восточная и южная (согласно регионам Черного моря). Вопрос существования южной популяции открыт и возможно это гибриды мраморноморской хамсы с черноморской.

В настоящее время в основном продолжают использовать метод идентификации азовской и черноморской хамсы, основанный на различии величины индекса отолитов [Сказкина, 1965]. Однако, с учетом сложности внутривидовой структуры и возможным существованием промежуточных форм, данная методика определения подвидов имеет определенные недостатки [Мельникова, 2011], позволяющие усомниться в правильности идентификации скоплений анчоуса, особенно смешанных.

Такая неоднозначность в идентификации смешанных скоплений и выявлении различных гибридных форм, не только на основании морфологических

параметров, но и при использовании овоцито-паразитологических и генетических подходов на основе белкового полиморфизма, является, совместно с перекрывающимися миграционными путями и эффектом дрейфа, фактом, заставляющим задуматься о существовании подвидов анчоуса в Азово-Черноморском регионе.

Кроме всего вышеизложенного, сомнения в правомочности выделения черноморского и азовского подвидов подкрепляются также тем, что в настоящее время анчоусы Атлантики и Средиземноморья не признаются в качестве валидных подвидов. Самые первые работы были проведены Fage [1911], который подразделил европейского анчоуса *E. encrasicolus* на две расы: атлантическую (разделена на северную и южную группы) и средиземноморскую (западная и восточная группы). Впоследствии, на территории Атлантического океана и Средиземноморья неоднократно выделяли популяции анчоуса с различным уровнем дифференциации, отличающиеся по тем или иным признакам. Так анализ 30 морфометрических и 5 меристических признаков показал наличие нескольких группировок анчоуса в Средиземноморском бассейне, отличающихся по морфологическим признакам [Tudela, 1999]. Авторы пришли к выводу, что данные отличия вызваны различными условиями обитания и изоляцией групп. Другая работа на основе анализа формы и размеров отолитов выявила 4 группы популяций, населяющих разные районы: север Атлантики, юг и север Средиземноморья, западное побережье Африки [Jema et al., 2015]. Анализ морфологических признаков позволял выделить группировки, эти отличия, в основном, объясняли либо различными условиями обитания, либо существующей изоляцией между группами (что привело к появлению дифференциации).

Все описанные по морфологическим характеристикам средиземноморские виды и подвиды в настоящее время включены в синонимию *E. encrasicolus* [Fricke et al., 2019], в отличие от ситуации в Азово-Черноморском бассейне, где ряд авторов до сих пор употребляет их в качестве валидных таксонов [Ninua, Japoshvili, 2008; Дирипаско и др., 2011 и др.]. В тоже время, активная миграция у анчоуса приводит к образованию смешанных скоплений, гибридизации данных форм и

сложности при определении состава таких скоплений. С учетом законодательной базы [O'Brien, Mayr, 1991; Winston, 1999; Zink, 2004], идентификация азовского и черноморского подвидов является важной не только научной, но и прикладной задачей, так как европейский анчоус в настоящее время является одним из основных промысловых видов в Азово-черноморском бассейне. Основной промысел происходит в водах Турции и Грузии, куда анчоус мигрирует на зимовку. Небольшая часть зимует у побережья Северного Кавказа, и у южного и западного берега Крыма [Зуев и др., 2007]. Лов хамсы у крымского побережья относится к одному из самых ранних и традиционных видов черноморского рыбного промысла [Тихий, 1917]. По данным различных авторов хамса в промысловых количествах зимовала у берегов Крыма в различные года [Майорова, 1950; Майорова, Чугунова, 1954; Тараненко, 1958; Данилевский, 1958; Аверкиев, 1960; Данилевский, 1964; Зайдинер, Попова, 1997]. Следует отметить, что черноморский и азовский подвиды имеют различные квоты на вылов и стоимость за каждую выловленную тонну.

С учетом всего вышесказанного, проблема внутривидовой дифференциации азово-черноморского анчоуса, несмотря на многолетние исследования, продолжает оставаться спорной и в настоящее время. С появлением возможности оценить уровень генетической дифференциации на основе анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей, необходимо проверить обоснованность выделения двух подвидов в Черном и Азовском морях: *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus*.

## **1.2. Филогеография европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus***

### **1.2.1. Характеристика объекта исследования**

Согласно последним исследованиям на основе молекулярно-генетических маркеров в роде *Engraulis* выделяют две группы: первая населяет западную часть Тихого океана и Атлантику (сюда входит европейский анчоус), вторая – восточную часть Тихого океана [Grant et al., 2005]. Ареал европейского анчоуса обусловлен

высокой толерантностью вида к гидрологическим условиям (показан на Рисунке 1).

Европейский анчоус является пелагической рыбой и планктонофагом. Кормовую базу составляют мелкие копеподы, ракообразные (мизиды), планктонные организмы (*Calanus*, *Pseudocalanus*, *Sagitta*), личинки моллюсков, фитопланктон [Световидов, 1964].

Обладает высокой воспроизводительной способностью: индивидуальная плодовитость самок может превышать 50 тысяч икринок; половой зрелости достигает на второй год жизни, имеет одно поколение в год, время жизни составляет 3 – 4 года [Parada et al., 2003]. Открытые океанические воды обладают меньшим количеством пищи и высоким числом пелагических хищников, что делает их менее пригодными для нереста анчоуса. Наибольшая выживаемость молоди наблюдается в более теплых умеренно стратифицированных водах [Bakun, 1996; Sundby, 1997; Allain et al., 2007; Allain, Petitgas, Lazure, 2007]. Более опресненные лиманы больше подходят молодым нерестящимся особям по обеспеченности пищи. Поэтому годовики нерестятся в основном в лиманах, в то время как взрослые особи предпочитают шельфовые зоны [Motos et al., 1996]. Икра анчоуса в основном плавает в верхних 10 м, периодически опускаясь до 20 м. Личинки опускаются гораздо глубже, и в зависимости от года их максимальное скопление может наблюдаться и на глубине 40 м. Чаще всего наибольшее их число находится над термоклином [Palomera, 1991]. Нерест происходит с конца мая до середины августа. Анчоус не может размножаться при температуре ниже 13 °С, что определяет места его нереста. В октябре собирается в косяки и уходит на зимовку [O'Connell, Raymond, 1970; Garcia, Palomera, 1996; Lisovenko, Andriyanov, 1996; Regner, 1996; Dulcic, 1997; Vorja et al., 1998; Allain et al., 2001].

Европейский анчоус является активно мигрирующим видом, что приводит к высокому потоку генов между популяциями. Способен перемещаться на большие расстояния. Во многих работах говорится о миграциях анчоуса через проливы Гибралтар, Босфор и Дарданеллы, что уменьшает уровень изолированности различных бассейнов.

Тем не менее, одной из причин морфологических отличий между выделяемыми подвидами *E.e. ponticus* и *E.e. taeoticus* считается изолированность между бассейнами. Другой причиной может являться различное время проникновения анчоуса в Азовское и Черное моря [Пузанов, 1936; Шевченко, 1980; Dobrovolov, 1992]. Из-за отсутствия палеонтологических данных время появления европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне однозначно не установлено. Известно, что в конце Плиоцена (2,5 млн лет назад) появляется связь между Средиземноморским и Черноморским бассейнами. На тот момент Черное море являлось солоноватоводным [Ekman, 1953; Vacescu et al., 1985; Tortonese et al., 1985]. Впоследствии связь между двумя бассейнами прекращалась в ледниковые периоды вследствие понижения уровня воды и восстанавливалась в межледниковье [Por, 1978].

Существует несколько гипотез о времени проникновения европейского анчоуса в Черное и Азовское моря. По одной из них, на основе рестрикционного анализа мтДНК и скорости мутирования митохондриальных генов, анчоус заселил Черное море около 100 000 лет назад и приспособился к низким температурам и скачкам солености, которые сопровождали ледниковые периоды [Magoulas et al., 1996; Magoulas et al., 2006].

Согласно другой теории [Dobrovolov, 1992], анчоус проникал в Черное море несколько раз, но в результате резкого падения солености полностью исчезал в данном регионе. Время последнего захода авторы сопоставляют с открытием пролива Босфор и окончательным формированием Черноморского бассейна, которое произошло 10 000 лет назад. Что же касается анчоуса, населяющего Азовское море, то было сделано предположение, что он появился раньше, около 27 000 лет назад в карангатский период, сумел адаптироваться к условиям меняющейся солености и сформировал изолированную популяцию [Ivanova, Dobrovolov, 2006]. Такое же мнение высказывалось и в других работах: азовского анчоуса рассматривали как филогенетически более древнюю расу и приспособленную к экстремальным условиям солености [Chashchin, 1996].

Следует отметить, что азовский анчоус по сравнению с черноморским, действительно, нереститься в районах с более низкой соленостью.

Существует также промежуточное мнение, что экспансия анчоуса, заселившего Азово-Черноморский регион, началась 50 тысяч лет назад, и в этот период он проник в Средиземноморский, а затем и в Азово-Черноморский бассейн [Grant, 2005].

Применение современных подходов в филогеографии на основе изменчивости митохондриальных генов позволяет провести реконструкцию возможных исторических событий, связанных с расселением анчоуса.

### ***1.2.2. Генетическая изменчивость по ядерным и митохондриальным генам в Атлантике и Средиземноморье***

Работы с использованием митохондриальных и ядерных маркеров показали, что внутривидовая структура европейского анчоуса в данном регионе гораздо сложнее, чем предполагалось ранее.

Появление молекулярно-генетических методов позволило провести ревизию и определить таксономический статус различных популяций европейского анчоуса и близкородственных ему видов. Так, на основе исследования ядерных маркеров, из Средиземного моря был описан новый вид *E. albidus* [Borsa et al., 2005]. Морфологически данный вид отличается от других по 2 морфометрическим и 5 меристическим признакам и в основном населяет прибрежные районы и солоноватоводные лагуны [Borsa et al., 2004; Bouchenak-Khelladi et al., 2008; Karahan et al., 2014].

Противоположная ситуация произошла с видом *E. eurystole* (Swain et Meek, 1884). С помощью молекулярно-генетических методов было показано отсутствие дифференциации между ним и *E. encrasicolus* [Silva, Horne, Castilho, 2014]. *E. eurystole* обитает в северо-западной части Атлантики и данные генетического анализа показывают, что это мигрирующий европейский анчоус, который сформировал у берегов Северной Америки отдельную популяцию, но выделение

ее в самостоятельный вид ошибочно. Авторами было предложено лишить *E. eurystole* статуса вида и таким образом расширить ареал европейского анчоуса до западных берегов Атлантики. Подобная ситуация показана и для вида *E. capensis* Gilchrist, 1913 [Grant, 1985; Grant et al., 2005].

Исследования Европейский анчоуса в Атлантическом океане и Средиземноморском бассейне проводили с использованием множества генетических маркеров: анализ белкового полиморфизма, изменчивость митохондриальных и ядерных генов, рестрикционный анализ мтДНК. Большинство работ показало достаточно сильную генетическую гомогенность европейского анчоуса в Атлантическом океане [Ouazzani et al., 2015]. В частности, было показано, что в Бискайском заливе в годы с увеличением численности возрастает и степень гомогенности [Motos et al., 1996].

В Средиземноморском бассейне отмечена более сложная популяционная структура. Анализ изменчивости контрольного региона мтДНК выявил существование 9 популяций. Отмечено, что на востоке региона наблюдается большая структурированность, в то время как на северо-западе – сильная генетическая гомогенность [Vinas et al., 2014]. Анализ аллозимов также подтвердил однородность популяций на северо-западе Средиземноморья, что связывают с тем, что это все одна панмиксная группа [Tudela et al., 1999].

Были выделены две формы: прибрежная (coastal) и океаническая (offshore marine). Данные две формы были выделены на основе следующих морфологических признаков: окраска тела, число позвонков, максимальная длина тела и скорость роста [Lee, Juge, 1965; Quignard, 1978; Levi et al., 1994; Bembo et al., 1996]. Анализ изменчивости митохондриальных (*cytb*) и ядерных (6 микросателлитных локусов) маркеров у этих двух форм показал несоответствие между результатами этих данных [Oueslati et al., 2014]. Особи, принадлежащие к разным митохондриальным линиям, не обладали дифференциацией по микросателлитным маркерам и наоборот. По данным микросателлитного анализа были подтверждены две группы, однако связи с изменчивостью мт гена *cytb* не установлено. Авторами было высказано предположение, что такая картина может

свидетельствовать о существовании экологических адаптаций на уровне митохондриального генома. Генетическая дифференциация в зависимости от глубины и удаленности от берегов точек сбора проб была установлена в работе по аллозимам (LDH, IDH, GPI) и митохондриальному гену ND5'6 [Borsa, 2002], а также по анализу интронных областей креатининкиназы [Borsa et al., 2004].

На основе 9 микросателлитных локусов и мт гена *cytb* выделили группу популяций анчоуса, которые, вероятно, зимуют в северной части Атлантического океана, а на нерест мигрирует в Бискайский залив [Silva et al., 2014]. Авторы отмечают, что наблюдаемая однородность на большей части ареала – это результат перемешивания скоплений анчоуса в местах нереста и высокого потока генов между популяциями.

Другие исследователи, неоднократно, указывали на существование популяции около северных берегов Африки (район пролива Гибралтар), которая достаточно сильно отличается от остальных популяций европейского анчоуса [Vinas et al., 2014]. В другой работе по анализу изменчивости *cytb* предполагается наличие криптического вида около берегов Марокко [Ouazzani et al., 2015]. Географическая изоляция двух форм (прибрежной и океанической) с последующим вторичным контактом могла привести к формированию криптического вида, который, однако, трудно отличить от генетически структурированных популяций. В одной из работ предполагают, что этот анчоус принадлежит к другому близкородственному виду *E. albidus*, выделенному ранее [Sanz et al., 2008]. Также высказывались предположения, что анчоус на севере Африки представляет собой гибрид *E. albidus* и *E. encrasicolus* [Bouchenak-Khelladi et al., 2008]. На основе анализа белкового полиморфизма высказано предположение о существовании так называемых африканской и европейской популяций, при этом анчоус, обитающий в Эгейском море, предположительно является их гибридом [Ivanova, Dobrovolev, 2006]. О возможном существовании этой гибридной популяции говорилось и в другой работе [Karahana et al., 2014]. На основе морфологического (форма тела и отолитов) и генетического (2 интрона СК6-1 и СК6-2; 10 микросателлитных локусов) анализов были выделены две формы

анчоуса: голубой и серебряный. Первый представлен только видом *E. encrasicolus*, в то время как второй представляет собой гибрид *E. albidus* и *E. encrasicolus*. В работе указывается на слабый поток генов между этими двумя формами, что может быть объяснено различиями в условиях обитания. Достоверно различается глубина сбора проб: голубой выловлен на 69 – 11 м, серебряный – от 9 до 77 м. Распределение данных форм коррелирует в большей степени с формами анчоуса, описанными выше (прибрежная и океаническая), чем с географической принадлежностью (различные бассейны).

На основе биохимического и генетического анализов выделяют другие две группы европейского анчоуса со степенью дивергенции, соответствующей статусу биологических видов. Эти две группы представлены в Адриатическом море и предполагается, что это также могут быть криптические виды [Borsa, 2002]. Подобная ситуация с криптическим видообразованием наблюдается и для японского анчоуса *E. japonicus* [Funamoto, Aoki, 2002].

Следует отметить, что многократно упоминалось о низкой дифференциации между различными географическими бассейнами и высокой дифференциации анчоуса в пределах одного региона [Sanz et al., 2008; Vinas et al., 2014]. Дивергенция между Атлантическим и Средиземноморским бассейнами обусловлена циркуляцией вод: в результате градиента солености, поверхностные атлантические воды входят в Средиземноморское море, что облегчает миграции анчоуса (и его личинок и икры) в этом направлении [Tintore et al., 1988]. С учетом вышесказанного следует, что для данного вида большее влияние в дифференциацию вносит экологическая (или другая) изоляция, чем полузакрытость данных морских систем.

### ***1.2.3. Две митохондриальные линии у европейского анчоуса***

Для изучения филогеографической структуры и этапов расселения европейского анчоуса по ареалу, традиционно использовались данные по изменчивости митохондриальных маркеров. Первые работы были проведены на основе рестрикционного анализа мтДНК для европейского анчоуса из

Средиземного моря, восточной части Атлантического океана и одной точки из Черного моря около берегов Болгарии [Magoulas, Zouros, 1993; Magoulas et al., 1996]. В дальнейшем работы по рестрикционному анализу повторялись с увеличением выборок и регионов [Grant, 2005; Magoulas et al., 2006]. Использовались и другие митохондриальные маркеры: 1 субъединица цитохромоксидазы (COI), цитохром b (*cytb*), контрольный регион (CR) [Borrell et al., 2012; Oueslati et al., 2014; Silva et al., 2014; Vinas et al., 2014; Ouazzani et al., 2015; Rappalardo et al., 2015; Castilho, Silva, 2016]. Все работы показали наличие двух клад А и В с уровнем дивергенции 1,5 – 3,2 %. При этом практически все выборки анчоусов из различных районов представляют собой смешанные скопления иногда с преобладанием представителей одной из митохондриальных линий, а распределение частот характерных гаплотипов имеет некоторую географическую направленность.

В Средиземноморском бассейне на севере преобладают особи, относящиеся к кладе В, на юге региона – к кладе А [Oueslati et al., 2014]. Такая же ситуация наблюдается и в Атлантическом океане [Silva et al., 2014]. В тоже время существуют различия и между бассейнами. В различных работах показано, что в Мраморном и Черном море преобладает клада А, в Адриатическом море – клада В, в остальной части Средиземноморья и Бискайском заливе данные клады представлены примерно одинаково [Magoulas et al., 1996; Magoulas et al., 2006; Rappalardo et al., 2015; Vinas et al., 2014]. Следует отметить, что часто в одном регионе встречаются выборки с противоположным соотношением митохондриальных линий [Borrell et al., 2012]. Особенно часто такая картина наблюдается в регионах, где происходит смешение различных популяций за счет миграций анчоуса (например, Бискайский залив).

Медианные сети, построенные для этих двух клад, отличаются по структуре. Так сеть для клады А имеет характерную для массовых пелагических рыб звездчатую структуру. Клада В обладает более сложной сетью гаплотипов [Magoulas et al., 2006].

В вопросе о происхождении двух митохондриальных линий единого мнения нет. В результате закрытия пролива Гибралтар 5,5 млн лет назад прервалась связь Атлантического океана со Средиземноморьем [Hsu, 1978]. Средиземное море на несколько сотен тысяч лет становится цепью соленых озер (данный период известен как Мессинский соленостный кризис) [Hsu et al., 1973; Hsu et al., 1978; Sara et al., 1985; Selli et al., 1985]. Полагается, что анчоус попал в Средиземноморский бассейн приблизительно 5 млн лет назад [Por et al., 1985; Magoulas, Tsimenides, Zouros, 1996; Dobrovolov, 1992]. Расхождение двух митохондриальных линий произошло гораздо позже. Время дивергенции, просчитанное по молекулярным данным, в разных работах отличается и варьирует от 500 тысяч лет [Borrell et al., 2012] до 1,85 млн лет [Grant, 2005]. Согласно последним данным на основе рестрикции мтДНК клада А возникла в Атлантическом океане (предположительно рефугиумом послужило побережье Западной Африки) [Grant, 2005; Magoulas et al., 2006]. Гипотеза об атлантическом происхождении клады А подтверждается работой, в которой показано, что все особи европейского анчоуса, найденного в северо-западной части Атлантики, относятся к кладе А [Silva et al., 2014]. Относительно происхождения клады В мнения расходятся. Согласно одной из гипотез она зародилась в Средиземном море [Magoulas et al., 2006]. По другой, клада В, как и клада А, имеет атлантическое происхождение [Grant, 2005; Borrell et al., 2012]. Дивергенция клад, вероятно, произошла вследствие изоляции популяций анчоуса атлантическими течениями, разделяющими север и юг Атлантического океана. Затем обе клады расселились в Средиземноморский и Азово-Черноморский бассейны. В тоже время, если клады А и В действительно проникли в Средиземное море в среднем или позднем плейстоцене (по Grant клада В заселила этот бассейн 250 тысяч лет назад, клада А – 50 тысяч лет назад), остается неясно тогда, какой анчоус все это время населял Средиземноморский бассейн и куда он потом исчез. Похожая картина наблюдается у *Sarda sarda*: существование двух митохондриальных линий объясняется аллопатрическим видообразованием в плейстоцене, последующей экспансией и повторным контактом [Vinas, Alvarado, Pla, 2004].

В некоторых работах предполагалось возникновение некоторой изоляции между этими двумя линиями [Oueslati et al., 2014].

Наличие некоторой клинальной изменчивости митохондриальной ДНК может свидетельствовать о существовании внешних факторов, которые приводят к такому распределению выделенных гаплогрупп. Как и в Атлантике, так и в Средиземноморье, проявляется некоторая закономерность: на севере бассейна преобладает клада В, на юге клада А. В тоже время отличий между двумя бассейнами на основе митохондриальной изменчивости нет. В следующей главе будут рассмотрены факторы, которые могли повлиять на формирование такого мозаичного распределения двух митохондриальных линий у европейского анчоуса на части ареала (в Атлантическом и Средиземноморском бассейне).

### **1.3. Клинальная изменчивость митохондриальных генов у европейского анчоуса**

Многие авторы считают, что распределение наблюдаемых филогенетических линий – это результат длительной изоляции и повторного контакта [Grant, 2005; Kristoffersen, Magoulas, 2008; Magoulas et al., 2006; Zarraonaindia et al., 2012]. Существует множество таких примеров для других пелагических рыб [Chlaida et al., 2009; Grant et al., 2006; Teacher et al., 2012]. В тоже время во многих исследованиях по анчоусу показано, что распределение гаплотипов имеет определенную географическую направленность, о чем говорилось выше.

Следует отметить, что генетическая клинальная изменчивость – это баланс отбора, дрейфа генов и истории распространения вида [Barton, Hewitt, 1985; Barton, Gale, 1993]. Наличие направленного отбора в первую очередь характерно для ядерных генов и в отношении митохондриальной ДНК полагалось, что ее изменчивость носит нейтральный характер и обусловлена случайными точечными мутациями. Поэтому в течение последних тридцати лет мтДНК широко используется в филогенетических исследованиях и, казалось, является идеальным маркером для реконструкции исторических процессов расселения видов и

установления родственных связей между группами [Avisé et al., 1987]. Однако все больше появляется работ, показывающих, что изменчивость митохондриальных генов может носить клинальный характер в результате направленного отбора под действием климатических флуктуаций [Blier et al., 2001; Willett, Burton, 2004; Quintela et al., 2014].

Возможность направленного отбора по митохондриальным генам связана с тем, что белки, кодируемые митохондриальной ДНК, вовлечены в энергетические процессы клетки и входят в различные белковые комплексы. Изменчивость в одном из 13-ти митохондриальных генов может иметь метаболические последствия. Так показано, что внутригеномная коадаптация между митохондриальными и ядерными белками может приводить к эволюции элементов комплекса переноса электрона (ETS), что вероятно изменяет уровень метаболизма [Willett, Burton, 2004]. Наибольшее влияние на изменчивость мтДНК в контексте адаптаций оказывает фактор температуры окружающей среды, о чем свидетельствует множество работ [Blier, Lemieux, 2001; Garvin et al., 2011]. При повышении температуры усиливается уровень метаболизма у мелких пелагических рыб [Elliott, 1976]. Другими гидрологическими факторами, которые, как доказано, влияют на метаболические процессы, являются концентрация кислорода и соленость [Claireaux, Lagardere, 1999].

В результате после работ, в которых пытались связать распределение двух митохондриальных линий с различными морфологическими и экологическими популяциями европейского анчоуса и их расселением по ареалу, был проведен анализ по влиянию гидрологических факторов на частоту встречаемости двух клад (на основе изменчивости *cytb*) [Silva et al., 2014]. В качестве возможных факторов были выбраны: концентрация кислорода, нитратов и фосфатов, температура и соленость. В работе охвачен почти весь ареал европейского анчоуса: Атлантический океан от южных берегов Африки до северных морей, весь Средиземноморский бассейн, однако Азовское и Черное море представлены не были. Выявлено 11 вариантов аминокислотной последовательности цитохрома b, с различной частотой встречаемости у двух митохондриальных линий. Генетические

тесты на нейтральность показали, что 4 аминокислоты находятся под направленным отбором: одна – положительным, три – отрицательным. Проведенный анализ на основе обобщенных линейных моделей (GLM анализ) показал, что современное распределение клад сформировано под действием температуры. Авторами предполагается, что клада А имеет тропическое распространение, а клада В – антитропическое. Вторым по степени влияния фактором является концентрация кислорода, затем соленость.

В другой работе этого автора на основе выдвинутой гипотезы о влиянии температуры на распространение двух клад проводится анализ формирования и исторического расселения анчоуса, относящегося к различным митохондриальным линиям, по ареалу [Silva et al., 2014].

Направленный отбор был обнаружен и у другого митохондриального гена COI [Pappalardo et al., 2015]. Были проанализированы несинонимические мутации, и Z-тест на нейтральность показал отрицательный отбор для семи аминокислот и положительный для двух. В данной работе анализировался анчоус, обитающий около берегов Италии.

Вышеупомянутые работы не охватывают весь ареал данного вида: Азово-Черноморский бассейн не представлен. Поскольку температурный и соленостный режимы вод Азовского и Черного морей сильно отличаются от вод атлантического и средиземноморского бассейнов, отсутствие данных по анчоусу из этих регионов может привести к некорректным выводам относительно температурной адаптации и влияния других факторов среды на изменчивость митохондриальной ДНК.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Исследованный материал

Для изучения дифференциации (морфологической и генетической) были получены пробы анчоуса в весенние и осенние сезоны 2009 – 2016 годов из траловых уловов судов типа СЧС и МРТК с юго-западного шельфа Крыма и Азовского моря, с лампарной съемки из Азовского моря и восточного шельфа Черного моря. Также были изучены экземпляры, предоставленные коллегами из Черного моря у берегов Турции и Грузии (2015 год), и материалы из зоологической коллекции ЗИН РАН. Для филогенетического анализа на всем ареале вида были взяты нуклеотидные последовательности европейского анчоуса из банка генетических данных GenBank. Для филогенетического анализа использовали 102 последовательности фрагмента гена *cytb* анчоуса из Средиземного моря и Атлантического океана (KF601435.1 – KF601437.1, KF601441.1, KF601443.1, KF601447.1 – KF601450.1, KF601452.1, KF601453.1, KF601456.1, KF601458.1 – KF601461.1, KF601463.1, KF601464.1, KF601468.1, KF601469.1, KF601477.1, KF601480.1, KF601481.1, KF601485.1, KF601486.1, KF601488.1, KF601490.1, KF601491.1, KF601493.1 – KF601499.1, KF601502.1 – KF601510.1, KF601512.1 – KF601517.1, KF601519.1, KF601521.1 – KF601524.1, KF601534.1, KF601536.1, KF601537.1, KF601540.1, KF601543.1, KF601544.1, JX683021.1, JX683023.1, JX683028.1, JX683031.1, JX683032.1, JX683035.1, JX683040.1, JX683044.1, JX683046.1, JX683047.1, JX683049.1, JX683051.1, JX683060.1, JX683062.1 – JX683067.1, JX683069.1, JX683071.1 – JX683074.1, JX683077.1 – JX683079.1, JX683084.1, JX683086.1, JX683094.1, JX683098.1 – JX683100.1, JX683103.1, JX683106.1 – JX683110.1, JX683112.1, JX683113.1). В качестве внешней группы был взят образец близкородственного вида японского анчоуса (*E. japonicus*) (номер в GenBank AB374222). Все нуклеотидные последовательности европейского анчоуса из Черного и Азовского морей, полученные в ходе данного исследования, депонированы в международный банк генетических данных GenBank (номера

КХ620959 – КХ621002). Всего было получено и проанализировано 85 последовательностей для этого региона. Объем обработанного материала, время и место сбора представлены в Таблице 1.

Рыба доставлялась в замороженном или свежем виде. Транспортировка материала в среднем длилась не более двух недель. Для генетических исследований отбиралась белая спинная мышца и спинной плавник, ткани фиксировались в 96% этаноле и хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Таблица 1 – Данные по особям европейского анчоуса, используемые для морфологического и генетического анализа

№	Место сбора	Время сбора	Число экз., морфология	Число экз., <i>cytb</i>	Число экз. STR
1	Керченский пролив	Октябрь 2010	36	0	0
2	Керченский пролив	Октябрь 2010	34	0	0
3	Евпатория	Ноябрь 2011	65	0	0
4	Севастополь	Ноябрь 2010	67	0	0
5	м. Лукул	Декабрь 2010	116	0	0
6	Донузлав	Ноябрь 2011	23	0	0
7	Севастополь	Декабрь 2011	35	13	0
8	м. Тарханкут	Декабрь 2011	27	0	0
9	м. Тарханкут	Ноябрь 2011	50	18	0
10	Керченский пролив	Декабрь 2011	72	14	0
11	м. Лукул	Январь 2012	44	0	0
12	Туапсе – Агой	Июнь 2013	0	0	22
13	Азовское море	Июнь 2013	0	0	30
14	Саки	Июнь 2015	0	0	4
16	Анаклия	Июль 2015	21	5	15
17	Трабзон	Июль 2015	17	10	10
18	Синоп	Июль 2015	21	9	20
19	граница Болгарии и Турции	Июль 2015	17	15	15
20	Бартын	Июль 2015	21	0	15
21	м. Лукул	Декабрь 2015	51	0	50
22	Азовское море (N46 <sup>0</sup> 37'8'' E37 <sup>0</sup> 31'7'')	Август 2016	25	0	25
23	Таганрогский залив	Август 2016	25	0	12
24	Анапа	Лето 2016	28	0	30
25	Берега Абхазии	Лето 2016	0	0	40
26	Карадаг (№ 32337 коллекция ЗИН РАН)	1950	4	0	0
<b>Всего</b>			<b>799</b>	<b>84</b>	<b>288</b>

У всех особей измерялась стандартная длина тела (SL) и для дальнейшей работы отбирались особи с SL выше 60 мм. Для проведения дальнейшего морфологического анализа использовались отолиты *sagitta* – парные образования, лежащие в слуховых камерах справа и слева от головного мозга. Чтобы проникнуть в слуховую камеру, в заглазничном отделе головы острым ножом или скальпелем с отступом 0,5-1,0 см от глаза делался косой надрез в поперечном направлении, разламывалась в этом месте голова и отолиты доставались скальпелем. Для сбора и хранения отолитов использовали бумажные пакетики, каждый из которых нумеровался. Перед дальнейшим анализом отолиты просветляли в глицерине.

## 2.2. Морфологический анализ

В качестве морфологических показателей измерялись стандартная длина тела (SL), длина отолита ( $l$ ), ширина отолита ( $d$ ), определялись индекс отолита ( $l/d$ ) и угол отолита, характеризующий открытие ЦБ ( $\beta$ ).

Длина без хвостового плавника определялась от конца рыла до начала лучей хвостового плавника с точностью до 1 мм. При измерении рыбу клали на мерную доску правой стороной, головой к торцовому бортику [Правдин, 1966; Баклашова, 1980].

Возраст рыб определяли по отолитам *sagitta* согласно стандартной методике [Чугунова, 1959]. Подсчет темных колец проводился на уплощенной стороне отолитов в отражённом свете с помощью микроскопа МБС-10. В дальнейшем анализировали отолиты особей в возрасте от года и более. Морфологический анализ проводился на базе лаборатории отдела «Физиология животных и биохимии» Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского.

Измерение длины и ширины отолита проводилось под стереоскопическим микроскопом МБС-10 с помощью окуляр-микрометра при увеличении 32. Замер длины отолита проводился от переднего до заднего конца отолита; ширина – от дорсального до вентрального края без учета зубчиков [Гетьман, 2001]. Индекс

отолитов определялся как отношение длины отолита к его ширине [Сказкина, 1965] отдельно для левого и правого отолита и затем рассчитывалось среднее значение.

Для измерения угла проводили фотографирование отолитов с помощью камеры Olympus C-5060 wide zoom при помощи адаптера RT5248 и светового микроскопа Biolar. Угол между антерострумом и рострумом отолита измеряли в программе Photoshop с помощью инструмента Ruler Tool. Угол  $\beta$  проводился через вершину рострума, основание ЦБ и вершину антерострума. Построение угла и измерение длины и ширины отолита показано на Рисунке 2.

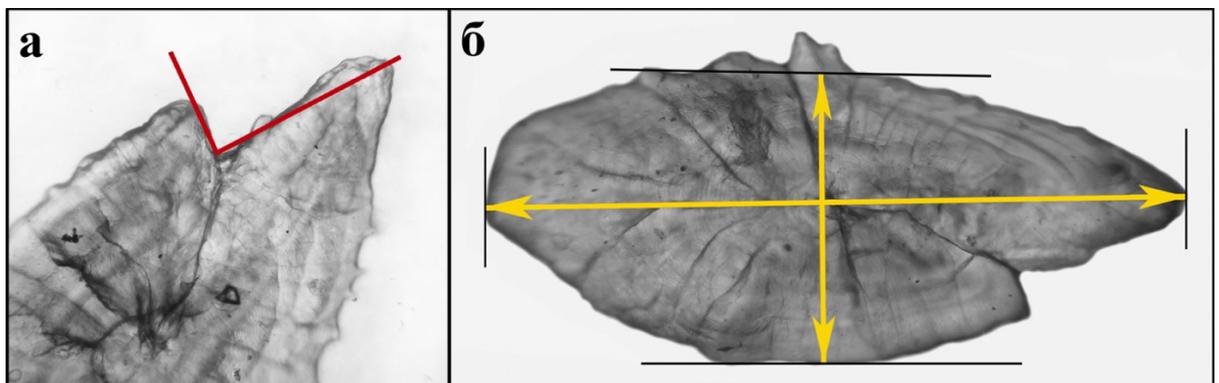


Рисунок 2 – Измерение параметров отолита; а – измерение угла отолита, б – измерение длины и ширины отолита

При проведении морфологического анализа производились прямые ( $l$ ,  $d$  и  $\beta$ ) и косвенные ( $l/d$ ) измерения параметров отолита. Была оценена погрешность их измерения.

#### *Оценка абсолютной погрешности прямых измерений*

Общая абсолютная погрешность измерения рассчитывалась по формуле [Бурдун, Марков, 1984; Кузнецов, Ялунина, 1995]:

$$\Delta F = \sqrt{\Delta F_{\text{инстр}}^2 + \Delta F_{\text{случ}}^2} \quad (1)$$

Инструментальная погрешность – погрешность, которая определяется погрешностями применяемых средств измерений; погрешность разброса или случайная – погрешность, обусловленная качествами оператора, а также несовершенством метода.

Инструментальная погрешность определялась по следующей формуле:

$$\Delta F_{\text{инстр}} = \Delta F_{\text{приб}} + \Delta F_{\text{отсч}} \quad (2)$$

Приборная погрешность определялась по следующим правилам:

- абсолютная погрешность цифровых приборов равна единице минимального разряда;
- для всех остальных (не стрелочных) приборов абсолютная погрешность принимается равной половине цены деления.

Погрешность отсчёта равна половине цены деления. Для цифровых приборов погрешность отсчета равна 0 [Коротков, Тайц, 1978; Рабинович, 1978; Земельман, 1991].

Погрешности разброса (случайная погрешность) определялась методом Стьюдента [Новицкий, Зограф, 1985; Светозаров, 2005]:

$$\Delta F_{\text{случ}} = \frac{\sum \Delta F_i}{i}, \quad (3)$$

где  $\Delta F_i = |< F > - F_i|$ .

Правила при измерении различных физических величин:

1. Если инструментальная ошибка является определяющей, т.е. ее величина существенно больше величины случайной ошибки, присущей данному методу, то достаточно выполнить измерение один раз.

2. Если случайная ошибка является определяющей, то измерение следует произвести несколько раз. Число измерений целесообразно выбирать таким образом, чтобы случайная ошибка среднего арифметического была меньше инструментальной ошибки с тем, чтобы последняя опять определяла окончательную ошибку результата.

На основе данного правила, определялось количество повторов измерения длины, ширины и угла отолита.

#### *Оценка погрешностей косвенных измерений*

Если физическая величина  $F$ , которую мы определяем косвенно, является функцией одной или нескольких переменных  $F = f(x, y, z)$ , то абсолютная ошибка функции  $F$ , обусловленная погрешностями ее аргументов, может быть найдена по правилам дифференцирования. Знак дифференциала  $d$  заменяется знаком ошибки

$\Delta$  и знаки выбираются таким образом, чтобы величина ошибки была максимальной, то есть

$$dF = \frac{\partial F}{\partial x} \cdot dx + \frac{\partial F}{\partial y} \cdot dy + \frac{\partial F}{\partial z} \cdot dz,$$

$$\Delta F = \frac{\partial F}{\partial x} \cdot \Delta x + \frac{\partial F}{\partial y} \cdot \Delta y + \frac{\partial F}{\partial z} \cdot \Delta z \quad (4)$$

где  $\Delta x$ ,  $\Delta y$  и  $\Delta z$  – общие абсолютные погрешности измерений  $x$ ,  $y$  и  $z$ .

Погрешность, рассчитанная по этой формуле, является максимальной и соответствует ситуации, когда все аргументы изучаемой функции имеют одновременно максимальное отклонение от своих средних значений [Бурдун и др., 1984; Корн, Корн, 1984; Тейлор, 1985].

### 2.3. Генетические лабораторные методы

#### *Выделение ДНК и амплификация*

Тотальная ДНК выделялась из образцов белой мышечной ткани, которые хранились в 96% этаноле при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Выделение ДНК проводилось с помощью метода солевой экстракции [Miller et al., 1988] или стандартного набора «ДНК-сорб-А» (Россия) с измененным протоколом (уменьшенное количество лизирующего раствора до 300 мкл). Качество ДНК проверялось в 1% агарозном геле.

Филогенетический и филогеографические анализы проводили с использованием фрагмента митохондриального гена цитохрома b (*cytb*) длиной 685 пар нуклеотидов. Данный участок амплифицировали с использованием праймеров 5'-AACGACGCAGTAGTAGACC и 5'-GAGGAAGTATCACTCAGGC [Oueslati et al., 2014] в 20 мкл реакционной смеси по следующему протоколу: предварительная денатурация при  $94^{\circ}\text{C}$  – 5 минут, затем 35 циклов (денатурация при  $94^{\circ}\text{C}$  – 15 секунд, отжиг при  $52^{\circ}\text{C}$  – 30 секунд, синтез при  $72^{\circ}\text{C}$  – 45 секунд) и конечная элонгация при  $72^{\circ}\text{C}$  – 5 минут.

Для изучения внутривидовой и популяционной структуры европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне были взяты десять микросателлитных локусов [Pakaki et al., 2009].

Аmplификация микросателлитных локусов проводилась в 10 мкл реакционной смеси по следующему протоколу: предварительная денатурация при 94 °C – 2 минуты, затем 35 циклов (денатурация при 94 °C – 45 секунд, отжиг при температуре амплификации – 45 секунд, синтез при 72 °C – 45 секунд) и конечная элонгация при 72 °C – 10 минут. Последовательности и характеристики праймеров, концентрация  $Mg^{2+}$  и температура амплификации для каждого праймера представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Праймеры для микросателлитных локусов

Локус	Мотив	Праймеры (5' – 3')	$T_{амплиф}$ , °C	$Mg^{2+}$ (мМ)
Ee2-91a	(AGG) <sub>12</sub>	AGAGCAGGTTCTTGCTGTGG TGTGGTGCCTACTATCAGG	55	1,5
Ee2-91b	(CCGCA) <sub>8</sub>	GGTCTTGAGCTTGGCATAGG CCGGAAGACACTCTGCACAC	60	2,0
Ee2-135	(ATTAG) <sub>10</sub>	AGGGCAGTGACAGGAGAGTC TCGTTACCCTGCGTTTATACTG	55	1,5
Ee2-165b	(CCT) <sub>7</sub>	GGGTGGGTTAAAGATGAAGC AGGGATCTTCAGGGAACCAG	59	2,5
Ee2-477	(AGG) <sub>7</sub>	TTGGTGAGGAAGCAACAGTG TAAGATGGCACGCTGACTTG	60	1,5
Ee2-407	(CA) <sub>13</sub>	AGGAATCTCCTTCCCGTCTC GTGGGTCTGTGGGTGTTTTG	60	2,0
Ee2-483b	(AGG) <sub>11</sub>	ATGAGAAGGAGGACGGTGTG AATGGGATAGCTCGTTGTGC	55	1,5
Ee2-508	(AGG) <sub>8</sub>	CACATGCTCGCTAAACATTG ACCTGATGCTGCTTGGTAGC	55	1,5
Ee2-376	(TG) <sub>11</sub>	CCACACCTACGGTGAGTGAC GCAAAGAGAATAGCACATGCAG	60	1,5
Ee2-452	(AC) <sub>13</sub>	CCCAACCCTAGGGAGACATC TCGTTACAGCAAGCATAACCC	59	2,5

Проверка длин ампликонов проводилась в 1,7% агарозном геле на основе трисацетатного буфера с окрашиванием ДНК бромистым этидием. Для определения концентрации полученных ПЦР-продуктов использовалась

программа TotalLab. Очистка на колонках перед секвенированием проводилась с помощью набора Omnix по стандартному протоколу.

#### *Секвенирование*

Секвенирование ПЦР продуктов проводилось в обоих направлениях с использованием стандартного набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc.) на базе ресурсного центра СПбГУ (г. Санкт-Петербург).

#### *Фрагментный анализ*

Фрагментный анализ проводился на анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc.) на базе лаборатории молекулярной генетики Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (г. Москва). Мультиплексы готовились с использованием меченых праймеров краской FAM, HEX, TAMRA. Последующее определение аллелей микросателлитных локусов различной длины проводилось с использованием программы GeneMarker.

Выделение ДНК и амплификация митохондриального гена *cytb* проводились на базе лаборатории молекулярной систематики Зоологического института РАН (г. Санкт-Петербург).

## **2.4. Филогенетический и популяционно-генетический анализы**

#### *Филогенетический анализ*

Филогенетический анализ проводился с использованием фрагмента митохондриального гена *cytb*. Полученные фрагменты *cytb* выравнивались в программе BioEdit [Hall, 1999] с обязательной доводкой вручную. Филогенетическое дерево строилось методом «ближайшего соседа» (NJ) с использованием двухпараметрической модели Kimura-2P [Kimura, 1980] и бутстреп тестом в 1000 репликаций в программе MEGA-6 [Tamura et al., 2013].

### *Демографический анализ*

В программе Network 4.5 реконструировалась медианная сеть, связывающая наблюдаемые гаплотипы [Bandelt et al., 1999]. Сети строились отдельно с указанием подвидовой и географической принадлежности гаплотипов.

Коалесцентный анализ был проведен в программе BEAST для реконструкции графика изменения эффективного размера популяции для проб из Азово-Черноморского бассейна (BSP анализ) [Drummond et al., 2005; Ho, Shapiro, 2011]. Было проведено 20 млн генераций с использованием модели GTR и строгих молекулярных часов с записью результатов каждые 1000 поколений. Значение clock rate составило 0,019 согласно с предыдущими исследованиями [Silva et al., 2014]. Визуализацию графика изменения эффективной численности популяции и оценку сводимости результатов анализа проводили в программе Tracer v.1.6 [Rambaut, Drummond, 2007].

В программе DnaSP 5.0 строился график попарных нуклеотидных различий и рассчитывалось значение  $\tau$  для экспансивной модели популяции. Оценка времени начала роста популяции проводилась по формуле предложенной Rogers [Rogers, Harpending, 1992]:

$$t = \frac{\tau}{2 \cdot 2\mu k}, \quad (5)$$

где  $t$  – время начала роста популяции в поколениях,  $\mu$  – скорость мутации гена на один нуклеотид,  $k$  – число нуклеотидов в локусе. Для митохондриального гена *cytb* для европейского анчоуса  $2\mu=0,02 \cdot 10^{-6}$  [Grant, 2005], с учетом длины фрагмента гена в данной работе,  $k=685$ .

### *Популяционно-генетический анализ*

В программе DnaSP 5.0 рассчитывались гаплотипическое ( $H_d$ ) и нуклеотидное ( $P_i$ ) разнообразие, их стандартные отклонения и значение индекса фиксации  $F_{st}$  [Librado, Rozas, 2009].

Для оценки межгрупповой генетической дифференциации были рассчитаны генетические дистанции  $D_{xy}$  [Nei, 1987]. Оценка соответствия характера нуклеотидных замен гипотезе нейтральности в исследованных пробах проводилась

с помощью Tajima D-теста [Tajima, 1989a] и теста Fu [Fu, 1997]. Все значения генетических параметров рассчитывались для особей европейского анчоуса из Азовского и Черного морей. Расчеты проводились отдельно для каждой выборки и при объединении всех проб.

Фрагментный анализ проводился только для особей европейского анчоуса из Черного и Азовского морей с целью изучения степени дифференциации популяций из различных районов этой части ареала.

Анализ аллельного и генетического разнообразия, расчет индексов фиксации производились в программе GenAlEx6.5 [Peakall, Smouse, 2006]. Оценка частот нуль-аллелей и поправки на них показателей разнообразия и индексов фиксации проведены в программе FreeNa [Chapuis, Estoup, 2006].

Для определения числа популяций в Азово-Черноморском бассейне, путей миграций и оценки смешанных скоплений использовалась программа Structure 2.3.4 [Evanno et al., 2005]. В программе задавались данные о фенотипе особей и их локалитетах. Так как европейский анчоус является активно-мигрирующей рыбой, для анализа данных была выбрана модель, предполагающая внутривидовую гибридизацию и перемешивание популяций (admixture model) [Falush et al., 2003]. Модель рассчитывалась в двух вариантах: с предварительной информацией о локалитетах особей (LocPrior) и без нее. Всего было сделано 100000 повторностей. Генетическая структура анализировалась для различного числа предполагаемых популяций ( $K=2-10$ ) и затем оценивалось оптимальное значение  $K$ . Оценка  $K$  проводилась двумя способами: анализ кривой  $L(K)$  [Rosenberg et al., 2001] и с использованием  $\text{hoc quantity } (\Delta K)$  [Evanno et al., 2005].

## **2.5. Анализ влияния факторов среды на распределение филогрупп**

Анализ влияния факторов среды на распределение частот встречаемости гаплотипов двух митохондриальных линий проводился для наших данных из Азовского и Черного морей (6 точек, 85 особей) и данных по остальной части

ареала анчоуса (63 точки) из других работ [Grant, 2005; Magoulas et al., 2006; Oueslati et al., 2014; Silva et al., 2014].

Значения гидрологических факторов (температуры, солености, концентраций кислорода, нитратов и фосфатов) на глубинах 0, 10, 25 и 50 м взяты из World Ocean Atlas 2013 (одноградусная карта) [Garcia et al., 2013; Garcia et al., 2013; Locarnini et al., 2013; Zweng et al., 2013]. Глубина выбиралась с учетом биологии вида [Palomera, 1991]. Гидрологические факторы брались в зависимости от месяца сбора проб в каждой точке (температура, соленость, концентрации кислорода, нитратов и фосфатов) на четырех глубинах (0, 10, 25 и 50 м). Для оценки различий значений гидрологических факторов на разных глубинах использовался дисперсионный анализ с применением критерия Фридмана и коэффициента Кендала. На основе полученных данных для дальнейшего анализа влияния температуры, концентраций нитратов и фосфатов на распределение гаплотипов, их значения брались на каждой глубине (0, 10, 25, 50 м). Так как концентрация кислорода и солености на данных глубинах не отличается, то в дальнейшем эти параметры рассматривались только на глубине в 10 м (Фридман:  $p=0,08$ ; критерий согласованности Кендала: 0,04).

Зависимость частот клад от гидрологических факторов подтверждалась с помощью непараметрического ANOVA Крускала-Уоллиса (H-тест) и медианного тестов, корреляционный анализ основывался на ранговом коэффициенте корреляции Спирмена [Масицкий, 2009]. Значения гидрологических факторов разбиты на диапазоны с использованием формулы Стерджесса. Соленость разделена в соответствии с классификацией соленостных зон: основная солоноватоводная, переходная солоноватоводная-морская, основная морская [Аладин, Плотников, 2013; Plotnikov, Aladin, 2011]. В качестве зависимой переменной была оставлена только частота клады А. Для статистической обработки данных использована программа Statistica 6.0.

В ходе проведения анализа, было выявлено ограничение на использование параметрических моделей. Тест на нормальность проводился с помощью критериев Колмогорова-Смирнова, Лилиефорса и Шапиро-Уилка. Анализ

значения частот клад А и В показал отсутствие нормального распределения (Колмогорова-Смирнова:  $d=0,16$ ,  $p<0,1$ ; Лилиефорса  $p<0,01$ ; Шапиро-Уилка:  $W=0,88$ ,  $p=0,00015$ ). Для гидрологических факторов нормальное распределение было подтверждено только для значений температуры (Колмогорова-Смирнова:  $d=0,08$ ,  $p>0,2$ ; Лилиефорса  $p>0,2$ ; Шапиро-Уилка:  $W=0,98$ ,  $p=0,54$ ). Отсутствие нормального распределения у исследуемых величин ограничивает дальнейший анализ использованием непараметрических критериев.

## **2.6. Моделирование географического распространения гаплогрупп (ГИС моделирование)**

Тестирование различных моделей распространения клад А и В по данным частоты встречаемости характерных гаплотипов проводилось в программе MaxEnt. Входящий файл был в формате \*.csv и представлял собой список координат, в которых встречались особи клад А или В. Плотность точек на единицу поверхности в местах сбора проб для каждой гаплогруппы определялась после ранжирования их частот:

- 0% - нет точек;
- 0 – 20% - 1 точка;
- 21 – 40% - 2 точки;
- 41 – 60% - 3 точки;
- 61 – 80% - 4 точки;
- 81 – 100% - 5 точек.

В качестве слоев, определяющих модель распространения гаплогрупп, были взяты факторы, характеризующие гидрологический режим и рельеф дна: профили, кривизна, наклон и вогнутость шельфа, среднегодовая температура и соленость, диапазон температуры и солености, среднее значение температуры в теплые месяцы, среднее значение температуры в холодные месяцы. Все значения были взяты из базы данных MARSPEC. Карта бралась с сеткой в пять минут, данные гидрологии взяты на поверхности. Для определения доверительного интервала

сделано 10 репликаций. Оценка вклада каждого фактора в модель проводилась с помощью теста Jackknife. Модель считалась в двух вариантах: с учетом всех сборов и только нерестовых групп (сборы проходили в период с апреля по сентябрь).

После анализа качества различных моделей и вклада параметров, в качестве факторов, влияющих на распространение двух гаплогрупп, были оставлены следующие: профили шельфа (bio1, bio2), наклон шельфа (bio6), среднегодовые значения температуры и солености (bio13, bio8), диапазоны температуры и солености (bio16, bio11). Для модели, анализирующей только нерестовые скопления на ареале, вместо среднегодового значения температуры использовалось ее значение в теплые месяцы, соответствующие периоду нереста европейского анчоуса (bio15).

Для моделирования возможного исторического распространения двух митохондриальных линий, полученная модель с учетом всех проб накладывалась на палеоклиматологические данные двух временных периодов: 6 тысяч лет назад и 21 тысячу лет назад.

## 2.7. Статистические методы

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов морфологического анализа были проведены с применением стандартных пакетов Excel 2016 и Statistica 6.0. Достоверность различий морфологических параметров оценивали при помощи параметрического *t*-критерия Стьюдента. Симметричность нового морфологического параметра (угла отолита  $\beta$ ) для левого и правого отолита оценивалась с помощью критерия Манна-Уитни. Проверка нормальности распределения проводилась методом хи-квадрат, теоретические частоты рассчитывались с помощью функции Лапласа. Достоверность различий средних выборочных значений морфологических критериев оценивали при помощи непараметрического дисперсионного анализа ANOVA. Анализ межгрупповой изменчивости морфологических признаков и

расчет классифицирующих уравнений проводили методом дискриминантного анализа [Мастицкий, 2009; Рокицкий, 1973].

Для анализа влияния факторов среды на распределение филогрупп на всем ареале, были объединены данные по соотношению клад из Азовского и Черного морей и данные для Средиземноморского и Атлантического бассейнов из других работ, указанных выше. После объединения были получены данные для 36 различных географических точек. Данные по температуре, солености, содержанию кислорода (apparent oxygen utilization – AOU), концентрациям нитратов и фосфатов на глубинах 0, 10, 25 и 50 м были взяты из World Ocean Atlas 2013 (одноградусная карта) [Garcia et al., 2013; Garcia et al., 2013; Locarnini et al., 2013; Zweng et al., 2013]. Тест на нормальность проводился с помощью критериев Колмогорова-Смирнова, Лилиефорса и Шапиро-Уилка, различия значений климатических факторов на разных глубинах оценивались с помощью дисперсионного анализа Фридмана и коэффициента Кендала. Для определения наличия зависимости частот клад от климатических факторов использовался непараметрический ANOVA Крускала-Уоллиса (H-тест), корреляционный анализ основывался на ранговом коэффициенте корреляции Спирмена [Рокицкий, 1973].

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Внутривидовая структура европейского анчоуса в Азово-Черноморском регионе

#### 3.1.1. Морфологические данные

В главе 1 говорилось о том, что в настоящее время основным морфологическим параметром для определения подвидов *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus* является индекс отоликов [Зуев и др., 2007; Зуев и др., 2011]. Его значения для азовского и черноморского анчоуса соответственно равны 1,96 и 2,15 [Сказкина, 1965]. С целью выяснения возможности использования индекса отоликов в качестве единственного критерия идентификации подвидов и уточнения ошибки определения подвидов был проведен анализ, описанный ниже. Мы проанализировали строение 346 отоликов у 183 особей европейского анчоуса (таблица 1, выборки 3 и 4). В анализ включены значения индекса отоликов у разноразмерных групп анчоуса, а также погрешность расчета данного параметра.

#### *Зависимость индекса отоликов от длины*

На Рисунке 3 показано, что морфологические характеристики отолика (длина и ширина) коррелируют со стандартной длиной рыбы. Эти результаты не противоречат другим исследованиям [Гетьман, 2005].

Зависимость между параметрами хорошо описывается уравнениями линейной регрессии:

$$l = 0,02 \cdot SL + 0,51; R^2 = 0,76$$

$$d = 0,01 \cdot SL + 0,35; R^2 = 0,67$$

Величина прироста по длине и ширине отолика отличается почти в 2 раза, что обуславливает также изменение индекса отолика особенно в первый год жизни анчоуса (Рисунок 4).

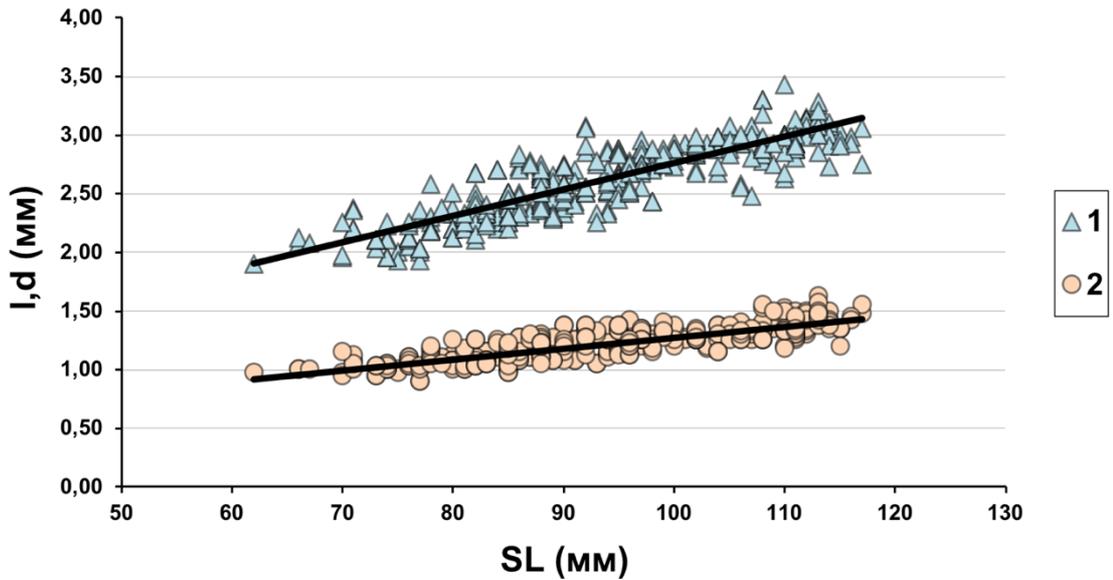


Рисунок 3 – Зависимость морфологических характеристик от стандартной длины рыбы (1 – длина отолита, 2 – ширина отолита)

Зависимость является не линейной как ожидалось ( $R^2=0,067$ ), а квадратичной и описывается уравнением:

$$l/d = -0,0003 \cdot SL^2 + 0,622 \cdot SL - 0,7281; R^2 = 0,855$$

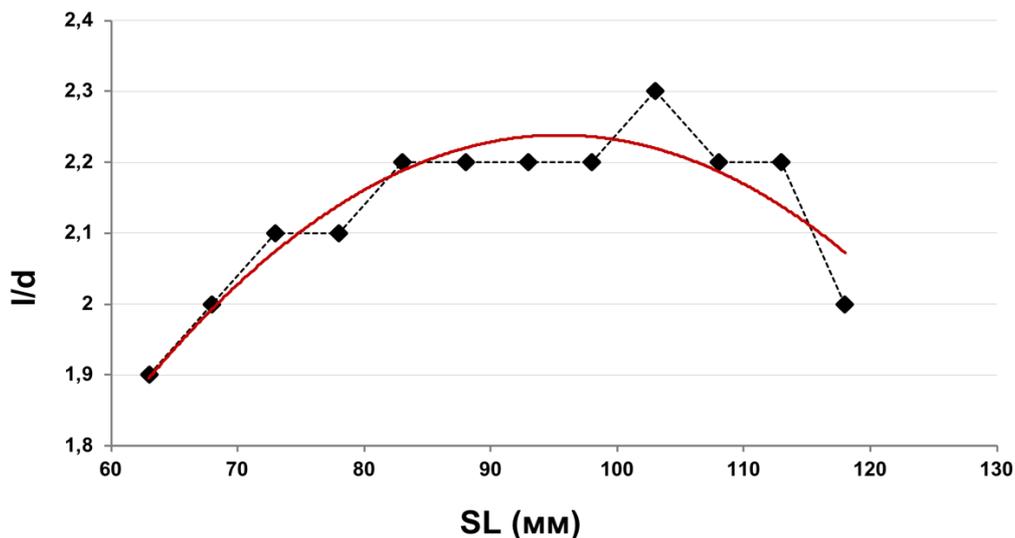


Рисунок 4 – Зависимость индекса отолитов от стандартной длины рыбы

В размерных группах от 60 до 80 мм значение  $I/d$  увеличивается от 1,9 до 2,2. Согласно размерно-возрастному ключу [Мельникова и др., 2010], данные особи

относятся к сеголеткам и частично годовикам, и такое изменение индекса отолита делает невозможным его использование для однозначной идентификации подвидов в данных возрастных выборках.

Следует отметить, что корреляция между линейными размерами рыбы и индексом отолита была ожидаема, так как черноморский анчоус крупнее и растет быстрее азовского. Этим и объясняется большее значение индекса отолита для черноморского подвида.

#### *Погрешность расчета индекса отолита*

Для расчета случайной погрешности длина и ширина одного отолита были измерены в 10-кратной повторности, в различные дни. Измерения проводились в относительных единицах окуляр-микрометра. Все значения длины, ширина и рассчитанного индекса отолита представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Расчет случайной погрешности индекса отолитов *E. encrasicolus*

Показатели	№ измерения									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
l (отн.ед.)	107	108	108	107	108	108	107	107	107	107
d (отн.ед.)	46	46	46	47	47	46	47	46	47	47
l/d	2,33	2,35	2,35	2,28	2,3	2,35	2,28	2,33	2,28	2,28

Значение случайной погрешности было рассчитано по формуле (3) и составило 0,02.

Так как индекс отолита является косвенным измерением, то инструментальная погрешность рассчитывалась по формуле (4). Индекс отолитов является функцией двух переменных:  $F = l/d = f(l, d)$ . Полная производная для данной функции:

$$d(F) = \frac{\partial F}{\partial l} \cdot d(l) + \frac{\partial F}{\partial d} \cdot d(d) = \frac{d(l)(d+l)}{d^2}$$

Дифференциал заменялся на ошибку и с учетом того, что  $\Delta l = \Delta d$  (инструментальная погрешность окуляр-микрометра для прямых измерений), получим:

$$\Delta F_{\text{инструм}} = \frac{\Delta l(d+l)}{d^2}$$

Инструментальная погрешность окуляр-микрометра бинокля МБС-10 определялась по формуле (2) и составила 0,025 мм. Расчет инструментальной погрешности для индекса отолита был проведен для  $l/d=2,39$  ( $l=2,625$ ,  $d=1,1$ ) и  $\Delta F_{\text{инстр}}=0,077$ .

Так как величина инструментальной погрешности существенно больше величины случайной ошибки, присущей данному методу, то достаточно выполнить измерение 1 раз.

Суммарная погрешность рассчитывалась по формуле (1) и ее значение составило 0,08. Для подтверждения погрешности измерение данного отолита было проведено 20 раз, в разное время, на биноклях МБС-10 и МБС-9 двумя разными людьми. Разброс значения индекса для одного отолита составил: 2,28 – 2,38 со средним значением 2,33.

Такое значение погрешности показывает, что округление индекса отолитов следует проводить не до сотых, как это делалось ранее, а до десятых. С учетом полученных данных, известные средние значения данного морфологического параметра для черноморской ( $l/d=2,15$ ) и азовской ( $l/d=1,96$ ) популяций следует заменить интервалами 2,1-2,3 и 1,9-2,1 соответственно. Это ограничение существенно влияет на кривые распределения значений индекса отолитов и, соответственно, на оценку подвидовой структуры анализируемых выборок.

На Рисунке 5 представлено распределение индекса для выборки 4 (Таблица 1). При округлении до сотых, график имеет три пика и, следовательно, можно предполагать, что это смешанное скопление, состоящее из трех популяций анчоуса. Однако при округлении до десятых все мнимые пики (показаны красными стрелками) исчезают и распределение принимает вид унимодальной кривой со средним значением 2,14, что характерно для однородного скопления. Полученные результаты ставят под сомнение предположения о существовании популяций со

значениями индекса отолита 2,06 и 2,41 [Зуев и др., 2007], так как это могло быть ошибкой метода (что было продемонстрировано выше).

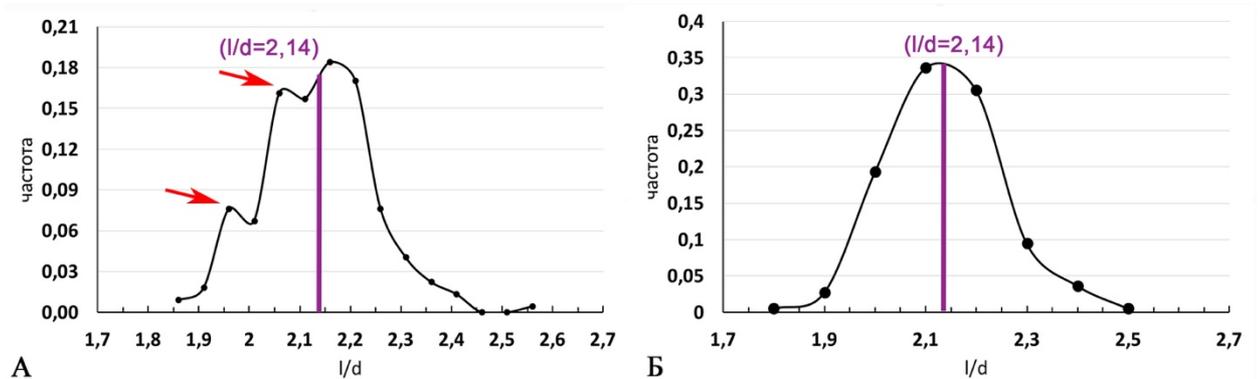


Рисунок 5 – Распределение индекса отолитов при округлении до сотых (А) и до десятых (Б)

Для решения проблемы идентификации подвидов был разработан дополнительный морфологический критерий, основанный на форме отолита [Водясова, Солдатов, 2017]. Ранее [Гетьман, 2004; Зуев и др., 2011] отмечали существование двух форм отолитов: веретеновидной и эллипсоидной, характерных для черноморского и азовского подвидов соответственно. Эти формы отличаются вырезкой центральной борозды (Рисунок 6), поэтому вторым морфологическим параметром отолита был выбран угол между рострумом и антерострумом.

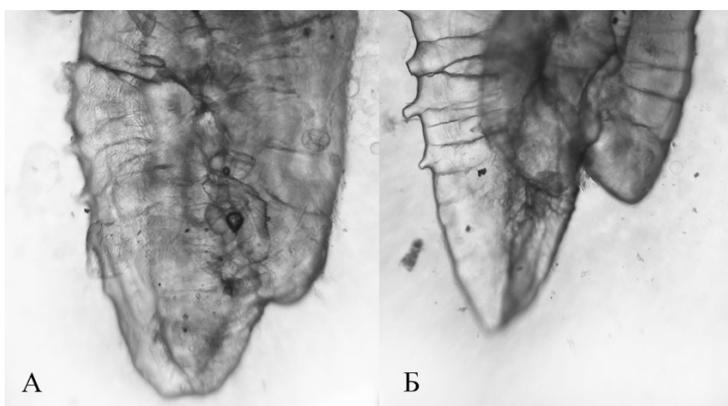


Рисунок 6 – Форма вырезки центральной борозды отолита у азовского (А) и у черноморского (Б) анчоуса

Для проверки пригодности данного критерия мы проанализировали 400 отолитов у особей, собранных в Черном море в районе Евпатории и Керчи в октябре 2010 и ноябре-декабре 2011 года.

Для определения погрешности измерения угла отолита ( $\beta$ ) его измеряли в десятикратной повторности. Все расчеты погрешностей были проведены по формулам, описанным выше.

Случайная погрешность для угла отолита составила  $1,9^0$ . Так как углы измерялись в программе Photoshop с помощью инструмента Ruler Tool, где цена деления равна  $0,1^0$ , это значение и было принято за инструментальную погрешность; погрешность отсчета равна 0 (согласно правилам для цифровых приборов). Так как случайная погрешность на порядок больше инструментальной, то необходимо многократное измерение данного параметра. Для определения оптимального числа повторов были проведены расчеты случайной погрешности для различного числа измерений угла для одного отолита (Таблица 4).

Таблица 4 – Погрешность угла  $\beta$  в зависимости от числа измерений

Измеряемый угол	Число повторов								
	10	9	8	7	6	5	4	3	2
$\beta$ , град	121,9	121,7	121,6	121,7	121,4	121,8	121,5	119,9	120,6
$\sigma_{(\beta)}$	0,8	0,9	1,0	1,2	1,4	1,6	2,0	1,7	2,6
$\Delta\beta_{\text{случ}}$ , град	1,9	2,1	2,4	2,9	3,5	4,4	6,3	7,2	33,0

Оптимальным является трехкратное измерение, при котором погрешность составляет  $7^0$  и округлять значения угла отолита необходимо до градуса.

Тест на нормальность с помощью критерия Пирсона подтвердил нормальное распределение ( $\chi^2=16,99$ ;  $p<0,05$ ). Симметричность левого и правого отолита подтверждена с помощью критерия Манна-Уитни ( $U=716$ ;  $p<0,01$ ). В дальнейшем измерялся угол у левого и правого отолита и рассчитывалось его среднее значение.

При анализе 260 отолитов была установлена корреляция индекса отолита  $l/d$  и угла  $\beta$  (Рисунок 7), коэффициент детерминации  $R^2=0,948$ .

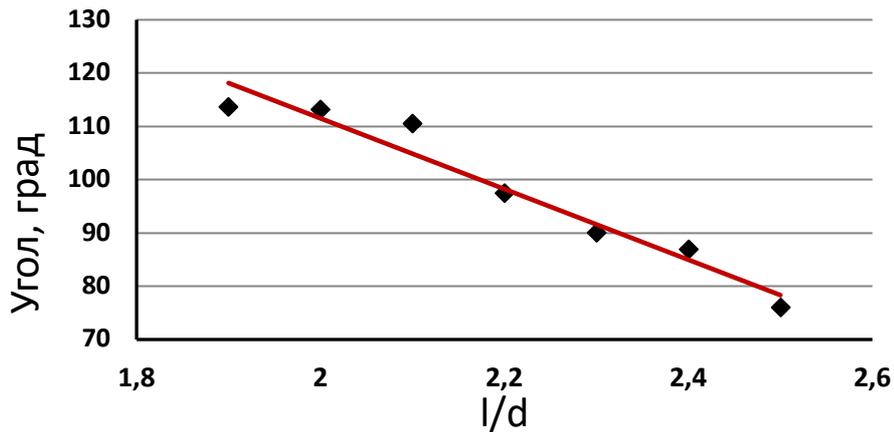


Рисунок 7 – Зависимость угла отолита от индекса отолита

Отрицательная корреляционная зависимость согласуется с данными из литературы о том, что эллипсоидная форма характерна для отолитов с меньшим значением  $l/d$ , а веретеновидная – с большим.

Для определения диапазонов значений угла, характерных для азовского и черноморского анчоуса необходимо было анализировать однородные скопления азовского и черноморского подвидов. В настоящее время, как упоминалось выше, для поточного определения подвида европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне используется только один морфологический параметр – индекс отолитов. Основываясь на распределении данного критерия, делают вывод о подвиновом составе рассматриваемых проб.

С целью выявить однородные пробы, на основе значений индекса отолита были проанализированы скопления хамсы, собранные у побережья Крыма (м. Тарханкут, Донузлав, м. Лукул, Керченский пролив) в 2010–2011 гг. Значения морфологических параметров для каждой пробы представлены в Таблице 5.

Чтобы обнаружить однородные группы, был проведён дискриминантный анализ и построена диаграмма для канонических дискриминантных функций (Рисунок 8).

Таблица 5 – Параметры отоликов хамсы *E. encrasicolus*, выловленной у берегов Крыма в 2010–2011 гг.

№ пробы	Место сбора	Число особей, экз.	Месяц и год сбора	Индекс отоликов ( $l/d$ )		Угол центральной борозды ( $\beta$ ), °	
				min–max	$M \pm m$	min–max	$M \pm m$
1	Азовское море	36	X.2010	1.9–2.3	$2.1 \pm 0.02$	72–136	$113 \pm 2$
2	Азовское море	34	X.2010	2.0–2.4	$2.2 \pm 0.02$	57–98	$77 \pm 1$
3	М. Лукул	44	I.2012	1.9–2.5	$2.2 \pm 0.02$	66–148	$106 \pm 3$
4	М. Тарханкут	27	XII.2011	1.9–2.4	$2.1 \pm 0.03$	84–149	$111 \pm 3$
5	Донузлав	23	XI.2011	2.0–2.4	$2.2 \pm 0.02$	65–161	$106 \pm 5$

Примечание: min–max – пределы варьирования показателя,  $M \pm m$  – среднее значение и его ошибка.

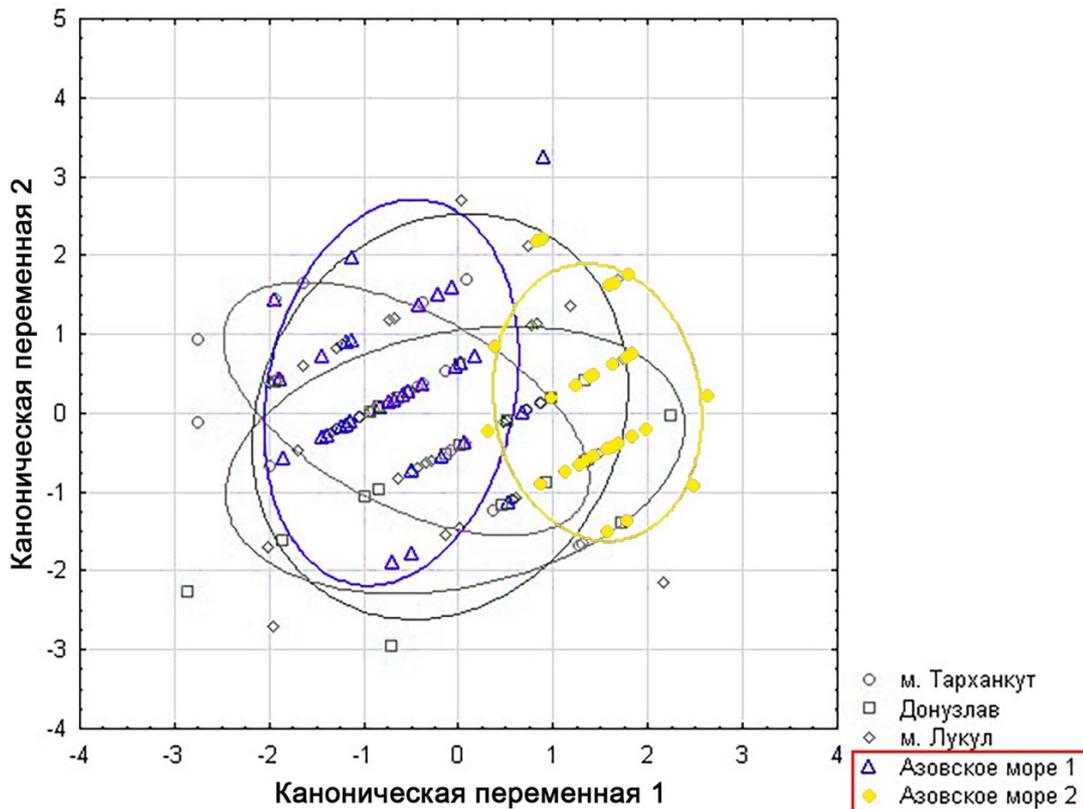


Рисунок 8 – Дискриминантный анализ морфологических параметров отоликов анчоуса *E. encrasicolus*, выловленного у побережья Крыма

Разделение по географическим точкам достоверно (Лямбда Уилкса = 0,576;  $F(8, 316) = 12,78$ ;  $p < 0,001$ ), хотя некоторые пробы являются смешанными и из-за этого сильно перекрываются. Пробы, собранные около м. Лукул и около

Донузлава, охватывают всю область значений. Наименьшую площадь перекрытия имеют две пробы анчоуса из Азовского моря, собранные в Керченском проливе (45°23' с.ш. 36°41' в.д.) во время выхода рыбы из Азовского моря на зимовку (выделены желтым и синим). Эти пробы (1 и 2) были собраны в разное время и представляют собой разные косяки. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA показал, что значения их морфологических характеристик достоверно различаются ( $F(2, 67)=100,72; p < 0,001$ ). Это позволяет полагать, что эти группы представляют разные подвиды.

Кривые распределения данных выборок по двум морфологическим параметрам отоликов (индекс и угол) представлены на Рисунке 9. Все графики являются одновершинными, что доказывает однородность данных косяков.

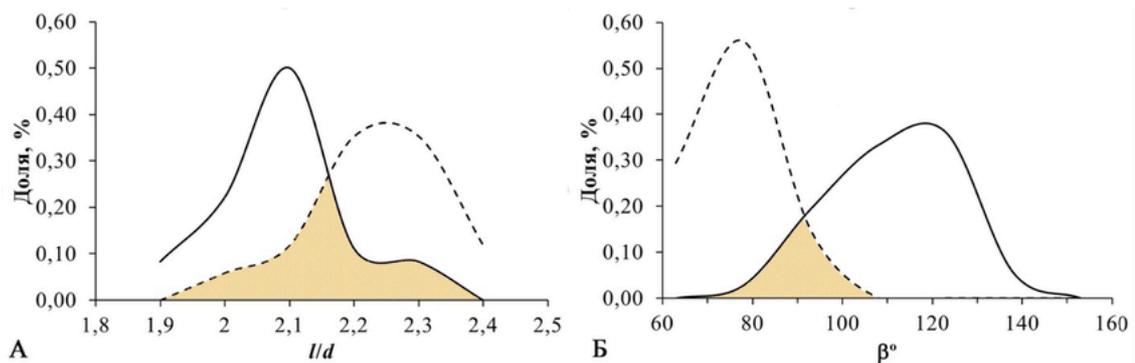


Рисунок 9 – Распределение значений морфологических параметров: индекса отоликов (А) и угла отоликов (Б) для первой (сплошная линия) и второй (пунктирная линия) выборки

Согласно принятым диапазонам для индекса отоликов (Сказкина, 1965), первая выборка представляет собой косяк азовской хамсы, вторая – черноморской. Наличие черноморского анчоуса в Керченском проливе не является неожиданным, так как было показано, что при неблагоприятных температурах и кормовых условиях в Черном море он заходит в Азовское море для нагула [Алтухов, 1974; Зуев, 2014].

Графики распределения значений индекса отоликов показали наличие перекрытия для двух подвидов (показано цветом). С учетом  $\sigma=0,1$ , около 30 %

особей попадает в интервал, характерный одновременно для азовского и черноморского анчоуса. Подвидовую принадлежность таких особей, руководствуясь только индексом отолита определить невозможно. Такая ошибка согласуется и с результатами погрешности, и с данными других авторов [Мельникова, 2011].

Зная подвидовую принадлежность каждой выборки, были определены диапазоны значений угла отолита для каждого подвида. Для нормального распределения согласно закону  $3\sigma$  в диапазон значений  $\bar{x} \pm 2\sigma$  будет попадать ~96% всей выборки. Это является достаточным для анализа смешанных скоплений хамсы и определения соотношения подвидов в пробе. Диапазон  $\bar{x} \pm 3\sigma$  для морфологических критериев является максимальным для каждого подвида. Рассчитанные диапазоны представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Диапазоны значений индекса и угла отолита для подвидов *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus*

Подвид	Число особей	Форма отолита	Индекс отолита l/d		Угол отолита $\beta$ , °	
			$\bar{x} \pm 2\sigma$	$\bar{x} \pm 3\sigma$	$\bar{x} \pm 2\sigma$	$\bar{x} \pm 3\sigma$
Азовская хамса	36	эллипсоидная	1,8÷2,2	1,7÷2,3	92÷148	78÷162
Черноморская хамса	34	веретеновидная	2,0÷2,4	1,9÷2,5	55÷95	45÷105

Был проведен дискриминантный анализ проб из Азовского моря, объединенных в одну выборку, на основе рассматриваемых морфологических параметров. Значения дискриминантных функций приведены в Таблице 7.

Оба морфологических параметра являются независимыми (значение толерантности 0,998), что позволяет использовать их для дифференциации анчоуса. Частичная статистика Уилкса лямбда показывает, что угол центральной борозды дает вклад в дискриминацию больше, чем индекс отолитов.

Таблица 7 – Дискриминантные функции для рассматриваемых параметров (l/d и  $\beta$ )

Параметр	Лямбда Уилкса	Частичная лямбда Уилкса	F-исключ. (1,67)	p	Толерантность
l/d	0,297	0,840	12,72	0,00067	0,998
$\beta$	0,656	0,381	108,96	0	0,998

Для получения классифицирующих уравнений объединенные выборки хамсы из Азовского моря были разделены на две совокупности: по одной (обучающей выборке) строилась дискриминантная функция, по второй (смешанной выборке) оценивалась эффективность классификации. Были получены следующие классифицирующие уравнения для идентификации двух подвидов:

$$S_{azov} = -215,348 + 172,395 \cdot \frac{l}{d} + 0,623 \cdot \beta;$$

$$S_{black} = -227,948 + 188,733 \cdot \frac{l}{d} + 0,379 \cdot \beta;$$

где  $S_{azov}$  и  $S_{black}$  – веса соответственно для азовской и черноморской хамсы.

Оценка эффективности анализа показала, что средняя ошибка идентификации подвидов анчоуса по дискриминантным уравнениям с двумя параметрами составила 3 %. Это на порядок меньше, чем при использовании индекса отолитов в качестве единственного дискриминирующего критерия. Такая ошибка может быть обусловлена и неоднородностью данных скоплений (наличие единично встречающихся особей другого подвида).

Для проверки правильности идентификации подвидов европейского анчоуса по полученным уравнениям, был проведен морфологический анализ четырех особей черноморского анчоуса *E. e. ponticus* из зоологической коллекции ЗИН РАН (Таблица 1, выборка 23). Следует отметить, что хранение проб в формалине, пагубно влияет на отолиты анчоуса (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Отолиты *E. e. ponticus* после хранения в формалине

Они становятся очень хрупкими и разрушаются при попытке их извлечь. Вероятность достать отолит целиком очень мала: из 13 особей, только у двух удалось это сделать (Рисунок 10.1). У части особей отолиты развалились полностью (Рисунок 10.3), но некоторые остались пригодными для измерения угла отолита (Рисунок 10.2), что позволяет сделать вывод о подвидовой принадлежности. Морфологические характеристики для рассмотренных особей представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Морфологические характеристики отолитов *E. e. ponticus* (коллекция ЗИН, номер 32337)

Номер особи	1	2	3	4
l/d	2,3	-	2,2	-
$\beta$ , град	72	67	92	71

Все значения параметров отолитов соответствуют полученным интервалам для черноморского подвида анчоуса, что подтверждает правильность идентификации подвидов на основе этих двух морфологических параметров отолитов.

Использование данных критериев для определения подвидовой принадлежности удобно по нескольким причинам. Во-первых, измерение угла, длины и ширины отолита, которые необходимы для его расчета, происходит одновременно с определением возраста по отолитам. Во-вторых, особи хамсы иногда доставляют уже в непригодном виде для проведения полного морфологического анализа. И, в-третьих, при использовании сразу двух критериев

определение подвидовой принадлежности более достоверно по сравнению с другими морфологическими характеристиками в силу меньшей вариабельности у особей с возрастом 1+ и больше (в отличие, например, от длины тела или показателей жирности [Мельникова и др., 2010; Tudela, 1999; Юнева и др., 2013]. Использование отолигов и их различных характеристик для определения подвидов или популяций не только анчоуса [Jema et al., 2015], но и других видов рыб в ихтиологических исследованиях очень распространено [Campana, Casselman, 1993; Campana, Neilson, 1985; Cardinale et al., 2004; Vignon, 2012].

На основе морфологических параметров отолига ( $l/d$  и  $\beta$ ) и полученных дискриминантных уравнений для двух подвидов европейского анчоуса *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus* была исследована подвидовая структура скоплений хамсы по всему Азово-Черноморскому бассейну. Рассчитанные значения  $l/d$  и  $\beta$  для всех выборок представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Морфологические характеристики скоплений европейского анчоуса в Азово-Черноморском регионе за 2010 – 2016 года

№	Место и время сбора	N	$l/d$		$\beta, ^\circ$		Соотношение подвидов, %	
			min÷max	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	min÷max	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	азов	черн
1	Керчь, 2010	36	1,9÷2,3	2,1±0,02	72÷136	113±2	100	0
2	Керчь, 2010	34	2,0÷2,4	2,2±0,02	57÷98	77±1	0	100
3	Севастополь, 2010	22	1,9÷2,4	2,2±0,02	69÷135	94±2	41	59
4	м. Лукул, 2010	110	1,9÷2,4	2,2±0,02	43÷127	82±2	23	77
5	Донузлав, 2011	23	2,0÷2,4	2,2±0,02	65÷161	106±5	57	43
6	Севастополь, 2011	35	2,0÷2,3	2,2±0,01	57÷160	100±4	49	51
7	м. Тарханкут, 2011	27	1,9÷2,4	2,1±0,03	84÷149	111±3	74	26
8	м. Тарханкут, 2011	50	1,9÷2,3	2,1±0,01	66÷154	105±3	68	32
9	Керчь, 2011	50	1,8÷2,1	2,0±0,02	84÷163	123±3	96	4
10	м. Лукул, 2012	44	1,9÷2,5	2,2±0,02	66÷148	106±3	61	39
11	Севастополь, 2014	89	1,8÷2,1	2,0±0,01	90÷152	117±1	100	0
12	Анаклия, 2015	21	2,0÷2,3	2,2±0,02	63÷141	86±4	14	86
13	Трабзон, 2015	17	2,0÷2,4	2,2±0,03	68÷106	86±2	6	94
14	Синоп, 2015	21	1,9÷2,4	2,1±0,03	68÷153	89±6	19	81
15	Болгария, 2015	17	2,0÷2,3	2,1±0,02	76÷112	91±2	18	82
16	Баргын, 2015	21	2,0÷2,4	2,2±0,02	72÷120	93±3	38	62
17	м. Лукул, 2015	50	1,9÷2,4	2,2±0,02	72÷167	109±3	68	32

Продолжение таблицы 9

№	Место и время сбора	N	l/d		$\beta, ^\circ$		Соотношение подвидов, %	
			min÷max	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	min÷max	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	азовский	черноморский
18	Азовское море, 2016	25	1,8÷2,3	2,2±0,01	80÷150	114±1	92	8
19	Таганрог, 2016	25	1,8÷2,6	2,2±0,01	80÷164	111±2	64	36
20	Анапа, 2016	28	1,8÷2,4	2,1±0,01	71÷129	103±1	71	29

На Рисунке 11 представлено распределение морфологических форм отолитов, которые характерны для подвидов *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus*.

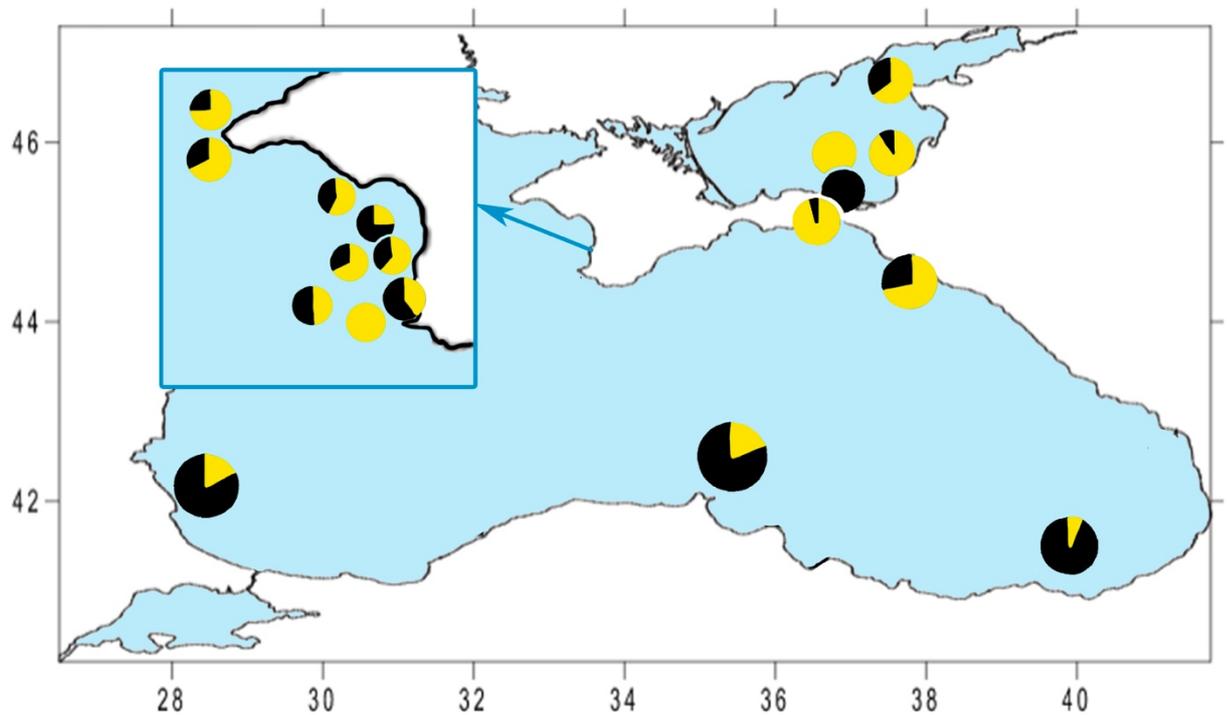


Рисунок 11 – Географическое распространение азовского (желтый цвет) и черноморского (черный цвет) подвидов европейского анчоуса

Выборки за разные года из одних географических точек показаны отдельно. Подвидовой состав в одних и тех же географических точках заметно варьирует, что вероятно связано с активным уровнем миграций. Тем не менее, существует общая закономерность: на юге преобладает форма близкая к черноморскому анчоусу, в то время как в Азовском море и северо-западной части Черного моря – к азовскому.

### 3.1.2. Генетические данные

#### Генетическая характеристика на основе данных изменчивости гена *cytb*

Изученный фрагмент митохондриального гена *cytb* содержит 685 пар нуклеотидов (пн) и соответствует положению 14463-15147 полного генома мтДНК европейского анчоуса (GenBank AP009137.1). Обнаружено 55 полиморфных сайтов (S), 23 замены являются информативными. Общее количество последовательностей в выравнивании составило 85, из них 44 гаплотипа, при этом 8 являются общими для двух подвидов хамсы. Нуклеотидные замены обнаружены в первом (6) и в третьем (49) положении кодона гена *cytb*. Соотношение азотистых оснований в рассматриваемом участке гена: Т – 31,8%, С – 26,3%, А – 23,5%, G – 18,4%.

Две мутации являются несинонимическими и привели к замене изолейцина на валин (позиция 247-249) и валина на изолейцин (позиция 256-258). Аминокислоты валин и изолейцин обладают схожими физико-химическими свойствами, и данные мутации не могут повлиять на свойства белковой молекулы. Таким образом, выявленные несинонимические мутации не влияют на положительный или отрицательный отбор.

Все рассматриваемые группы хамсы характеризуются высоким гаплотипическим и низким нуклеотидным разнообразием (Таблица 10).

Таблица 10 – Основные характеристики изученных выборок

Выборка	N	Подвидовая структура, %		Номера в GenBank	Параметры генетической изменчивости						
		Азов	Черн		h	S	S <sub>inf</sub>	Hd±SD	Pi±SD	D	F <sub>s</sub>
мыс Тарханкут	18	61	39	KX620959-KX620969	1 1	2 1	11	0,941±0,033	0,005±0,001	-1,56	-3,51
Сев-поль	13	46	54	KX620970-KX620976	1 0	1 4	5	0,962±0,041	0,004±0,001	-1,58	-5,48
Керч. пролив	14	100	0	KX620977-KX620985	1 2	2 1	4	0,978±0,035	0,006±0,001	-1,71*	-6,88*
Батуми	5	40	60	KX620990-KX620993	5	8	0	1,000±0,126	0,006±0,006	-1,17	-2,12
Трабзон	10	10	90	KX620994-KX620998	1 0	1 8	2	1,000±0,045	0,006±0,001	-1,67*	-6,79*
Синоп	9	11	89	KX620999-KX621002	8	1 2	2	0,972±0,064	0,005±0,001	-1,40	-4,22

Продолжение таблицы 10

Выборка	N	Подвидовая структура, %		Номера в GenBank	Параметры генетической изменчивости						
		Азов	Черн		h	S	S <sub>inf</sub>	Hd±SD	Pi±SD	D	F <sub>S</sub>
Босф. пролив	15	20	80	KX620986- KX620989	1 2	1 7	7	0,971±0,033	0,005±0,001	-1,26	-6,55
Общее	84				4 4	5 5	23	0,962±0,000	0,005±0,000	- 2,24**	-45,14**

Примечание: N – объем выборок, h – число гаплотипов, S – число полиморфных сайтов, S<sub>inf</sub> – число информативных замен, Hd – гаплотипическое разнообразие, Pi – нуклеотидное разнообразие, D – значение Tajima D-теста на нейтральность, F<sub>S</sub> – значение Fu-теста на нейтральность

Значения тестов на нейтральность D и F<sub>S</sub> отрицательны, наблюдаемая кривая сравнений попарных нуклеотидных отличий совпадает с ожидаемой при применении модели экспансивного роста (Рисунок 12), что также подтверждает резкое увеличение численности популяции в данное время.

Все расчетные генетические критерии подтвердили низкую генетическую гетерогенность популяций анчоуса в Азово-Черноморском бассейне. Величина критерия общей генетической дифференциации (индекс фиксации  $F_{st}$ ) [Wright, 1951] мала и составила -0,00046. График сравнений попарных нуклеотидных различий с применением модели роста популяций имеет вид унимодальной кривой (Рисунок 12), что тоже свидетельствует о генетической однородности европейского анчоуса в данном регионе.

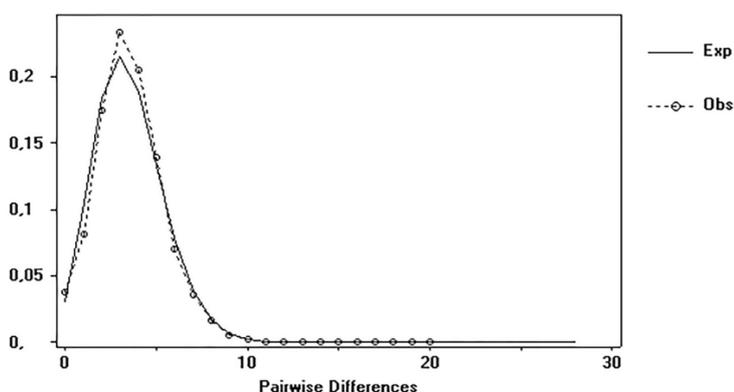


Рисунок 12 – График сравнений попарных нуклеотидных отличий для популяций анчоуса в Азово-Черноморском регионе. По оси абсцисс – число замен при попарном сравнении, по оси ординат – вероятность в долях

Полученные значения генетических дистанций между различными географическими точками сбора также не выявили генетических отличий (Таблица 11).

Таблица 11 – Межгрупповая генетическая дифференциация

Выборки	мыс Тарханкут	Сев-ль	Керченский пролив	Анаклия	Трабзон	Синоп	Болгария
мыс Тарханкут	-	0,0048	0,0055	0,0051	0,0055	0,0049	0,0054
Севастополь	0,00086	-	0,0049	0,0045	0,0053	0,0044	0,0049
Керченский пролив	0,00096	0,00088	-	0,0059	0,0059	0,0050	0,0054
Батуми	0,00125	0,00114	0,00123	-	0,0055	0,0046	0,0051
Трабзон	0,00097	0,00094	0,00103	0,00135	-	0,0053	0,0057
Синоп	0,00096	0,00082	0,00097	0,00121	0,00104	-	0,0048
Босфорский пролив	0,00091	0,00078	0,00092	0,00115	0,00100	0,00087	-

Примечание: над диагональю – генетические дистанции  $D_{xy}$ , под диагональю – их среднеквадратичные отклонения.

Медианная сеть гаплотипов, построенная по принципу минимального числа нуклеотидных различий, представлена на Рисунке 13. Сеть характеризуется небольшим числом гаплотипов, имеющих высокую частоту, а основное количество гаплотипов, являются уникальными. Во всех исследованных локалитетах наблюдается картина «звёздчатой» радиации гаплотипов в результате единичных нуклеотидных замен. Такой тип медианной сети гаплотипов характерен для большинства морских видов рыб [Avice, 2000]. Наличие возможных альтернативных связей между гаплотипами (петлевые структуры в сети) может быть результатом гомоплазии, т.е. повторных и обратных мутаций в мтДНК.

Построенная медианная сеть гаплотипов не выявила генетических отличий по митохондриальному гену *cytb* ни при сравнении особей из различных районов, ни при сравнении различных подвидов.

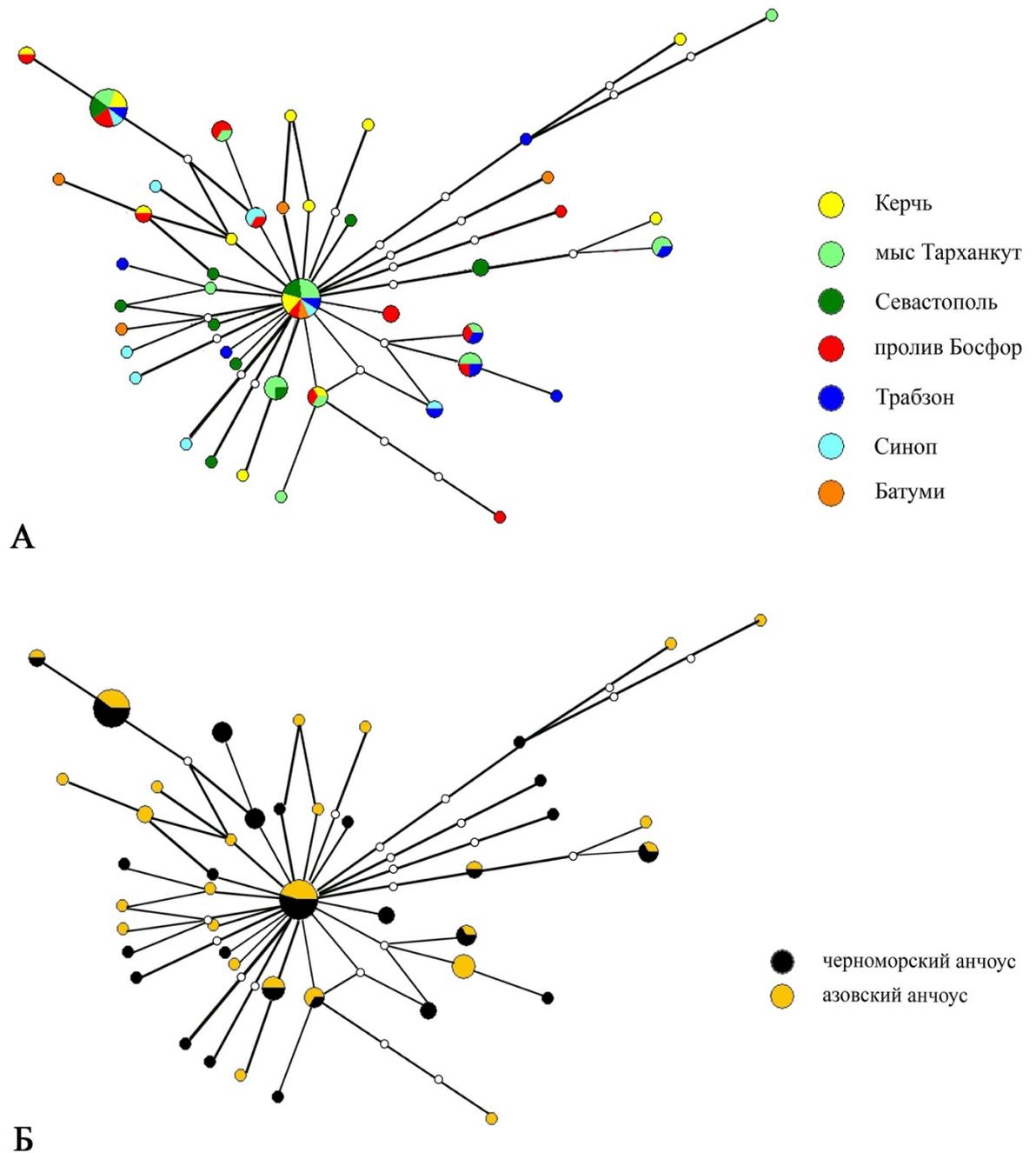


Рисунок 13 – Медианная сеть гаплотипов европейского анчоуса из Азовского и Черного морей. Гаплотипы раскрашены в зависимости от места сбора проб (А) и в зависимости от подвидовой принадлежности (Б). Не закрашенные круги указывают промежуточные гаплотипы. Величина круга пропорциональна количеству идентичных гаплотипов, длина ветвей – количеству замен (между двумя соседними гаплотипами одна нуклеотидная замена).

Время начала роста азово-черноморской популяции анчоуса можно рассчитать исходя из данных по изменчивости *cytb*. Согласно расчетам, начало роста следует отсчитывать как 128321 поколений назад. Так как у европейского анчоуса появляется одно поколение в год [Lisovenko, Andriouanov, 1996; Parada et al., 2003], то рост азово-черноморской популяции начался примерно 128 тысяч лет назад.

Проведена оценка изменения эффективной численности европейского анчоуса на основе данных по Азово-Черноморскому бассейну с использованием коалесцентного Баесова анализа (BSP-анализа) (Рисунок 14). Время начала роста азово-черноморской популяции совпадает с расчетным значением [Rogers, Harpending, 1992].

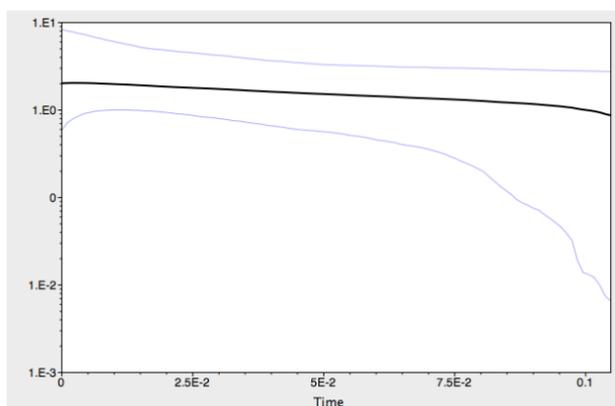


Рисунок 14 – Результаты BSP-анализа на основе изменчивости *cytb* для анчоуса из Азово-Черноморского бассейна. По вертикальной оси – эффективная численность популяции на логарифмической шкале, по горизонтальной оси – время в млн лет.

#### *Внутривидовая структура на основе данных по микросателлитным локусам*

Помимо анализа изменчивости митохондриального гена, наследующегося матрилинейно, был проведен анализ изменчивости ядерных микросателлитных локусов. Мы предположили, что отсутствие дифференциации подвидов по цитохрому *b* не было выявлено в силу того, что это очень молодые формы и не

произошла фиксация замен. Микросателлиты были выбраны как более переменные по сравнению с митохондриальным геном *cytb*.

Были проанализированы 10 микросателлитных локусов для 288 особей из различных районов Черного и Азовского морей. Три локуса были удалены из дальнейшего анализа вследствие плохой амплификации (Ee2-376, Ee2-452, Ee2-477). При дальнейшем анализе были исключены особи, у которых не амплифицировалось более одного локуса или были проблемы с точным определением длин аллелей. Так у части особей из районов Туапсе, Абхазии и Севастополя невозможно было определить длину аллелей для локуса Ee2-477 так как мотив достаточно короткий. Таким образом, финальный микросателлитный анализ проводился у 208 особей анчоуса из 10 локалитетов по 7 микросателлитным локусам (Ee2-508, Ee2-135, Ee2-91b, Ee2-407, Ee2-91a, Ee2-165, Ee2-483b). Общая характеристика всех микросателлитных локусов дана в Таблице 12.

Таблица 12 – Показатели генетического разнообразия европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне по 7 микросателлитным локусам

	Локус						
	Ee2-165	Ee2-135	Ee2-483b	Ee2-91b	Ee2-407	Ee2-508	Ee2-91a
<b>N</b>	205	208	189	208	208	207	189
<b>Na</b>	5	15	11	10	18	19	9
<b>Nap</b>	3,700 (0,300)	9,900 (0,900)	5,700 (0,559)	6,400 (0,499)	8,100 (0,888)	7,500 (0,969)	6,300 (0,423)
<b>Ne</b>	2,400 (0,146)	6,423 (0,462)	3,711 (0,282)	4,501 (0,249)	5,038 (0,299)	3,780 (0,350)	4,826 (0,281)
<b>I</b>	1,014 (0,070)	2,000 (0,082)	1,416 (0,099)	1,607 (0,057)	1,744 (0,072)	1,530 (0,123)	1,656 (0,063)
<b>Ho</b>	0,563 (0,042)	0,729 (0,037)	0,518 (0,067)	0,807 (0,033)	0,689 (0,042)	0,371 (0,036)	0,434 (0,061)
<b>He</b>	0,569 (0,026)	0,837 (0,012)	0,712 (0,029)	0,771 (0,014)	0,795 (0,012)	0,708 (0,034)	0,786 (0,013)
<b>Nm</b>	10,606	5,037	2,460	5,184	3,699	3,626	4,545
<b>F</b>	0,004 (0,069)	0,124 (0,053)	0,296 (0,089)	-0,046 (0,037)	0,136 (0,051)	0,444 (0,082)	0,439 (0,085)

## Продолжение Таблицы 12

	Локус						
	Ee2-165	Ee2-135	Ee2-483b	Ee2-91b	Ee2-407	Ee2-508	Ee2-91a
<b>F<sub>IS</sub></b>	0,011	0,128	0,272	-0,047	0,134	0,475	0,448
<b>F<sub>IT</sub></b>	0,034	0,169	0,339	0,002	0,189	0,509	0,477
<b>F<sub>ST</sub></b>	0,023	0,047	0,092	0,046	0,063	0,064	0,052

Примечание: среднее значение рассчитывалось для десяти локалитетов. В скобках дано стандартное отклонение. Обозначения: N – объём выборки, N<sub>a</sub> – число аллелей на локус, N<sub>ap</sub> – среднее число аллелей на локус, N<sub>e</sub> – среднее эффективное число аллелей, I – среднее значение индекса Шеннона, N<sub>o</sub> – средняя наблюдаемая гетерозиготность, N<sub>e</sub> – средняя ожидаемая гетерозиготность, F – среднее значение индекса фиксации, F<sub>IS</sub>, F<sub>IT</sub>, F<sub>ST</sub> – значения F-статистики Райта, N<sub>m</sub> – поток мигрантов.

Генетическое разнообразие во всем Азово-черноморском бассейне достаточно высокое и соразмерно по всем локусам (I находится в диапазоне от 1,014±0,070 до 2,000±0,082). В большинстве локусов наблюдаемое значение гетерозиготности меньше, чем ожидаемое, что подтверждается положительными значениями индексов фиксации F. Значения F<sub>ST</sub> колеблется от 0,023 до 0,092, что согласно Райту, соответствует слабой генетической дифференциации.

В Таблице 13 приведены рассчитанные частоты всех аллелей каждого локуса для всех десяти локалитетов. Для каждого аллеля были рассчитаны значения p для проверки отклонения от уравнения Харди-Вайнберга.

Таблица 13 – Наблюдаемые частоты аллелей для 6 локусов в десяти различных географических районах сбора проб

Локус	Аллель	Абхазия	Азов	Анаклия	Анапа	Барцын	Болгария	Севастополь	Синоп	Трабзон	Туапсе
Ee2 - 165	pHWE	0,771	0,914	0,016	0,956	0,873	0,880	0,496	0,894	0,522	0,343
	N	29	33	15	30	13	10	44	19	9	3
	183	0,121	0,061	0,100	0,067	0,000	0,000	0,045	0,000	0,000	0,167
	186	0,241	0,288	0,233	0,200	0,231	0,300	0,261	0,342	0,278	0,333
	189	0,534	0,515	0,467	0,600	0,654	0,700	0,614	0,526	0,667	0,500
	192	0,103	0,106	0,133	0,133	0,115	0,000	0,080	0,105	0,056	0,000
	195	0,000	0,030	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,000	0,000
Ee2 - 135	pHWE	0,000	0,067	0,937	0,155	0,347	0,623	0,000	0,272	0,423	0,532
	N	30	33	15	30	13	10	45	20	9	3
	112	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	117	0,017	0,045	0,000	0,017	0,077	0,000	0,011	0,075	0,000	0,000
	122	0,033	0,061	0,033	0,067	0,038	0,000	0,111	0,100	0,056	0,000
	127	0,100	0,091	0,167	0,083	0,077	0,100	0,167	0,025	0,222	0,167
	132	0,100	0,045	0,100	0,217	0,038	0,200	0,144	0,100	0,111	0,000
	137	0,300	0,333	0,200	0,117	0,231	0,100	0,211	0,200	0,111	0,167
	142	0,183	0,197	0,167	0,183	0,038	0,200	0,156	0,100	0,111	0,333
	147	0,133	0,030	0,267	0,117	0,115	0,350	0,089	0,225	0,056	0,000
	152	0,033	0,091	0,033	0,100	0,038	0,050	0,022	0,025	0,111	0,000
	157	0,017	0,091	0,033	0,017	0,038	0,000	0,033	0,025	0,000	0,000
	162	0,050	0,015	0,000	0,000	0,077	0,000	0,011	0,025	0,000	0,000
	207	0,033	0,000	0,000	0,000	0,115	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	222	0,000	0,000	0,000	0,050	0,038	0,000	0,022	0,025	0,056	0,167
	227	0,000	0,000	0,000	0,017	0,077	0,000	0,011	0,075	0,167	0,167
230	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	
Ee2 - 483 b	pHWE	0,317	0,959	0,298	0,001	0,242	0,052	0,303	0,527	0,722	0,157
	N	29	32	15	28	9	8	42	18	6	2
	206	0,259	0,156	0,167	0,143	0,056	0,125	0,238	0,056	0,000	0,000
	209	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	212	0,017	0,016	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000
	215	0,052	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,000	0,000	0,000
	218	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	221	0,121	0,109	0,133	0,107	0,167	0,188	0,083	0,139	0,083	0,500
	224	0,310	0,281	0,333	0,357	0,278	0,500	0,167	0,333	0,500	0,000
	227	0,224	0,359	0,267	0,321	0,278	0,188	0,357	0,333	0,333	0,000
	230	0,017	0,063	0,033	0,036	0,056	0,000	0,119	0,111	0,083	0,500
	233	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000
236	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	

Продолжение Таблицы 13

Локус	Аллель	Абхазия	Азов	Анаклия	Анапа	Барцын	Болгария	Севастополь	Синоп	Трабзон	Туапсе
Ee2 - 91b	pHWE	<b>0,895</b>	<b>0,592</b>	<b>0,663</b>	<b>0,815</b>	<b>0,679</b>	<b>0,647</b>	<b>0,827</b>	<b>0,515</b>	<b>0,798</b>	<b>0,532</b>
	N	<b>30</b>	<b>33</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>45</b>	<b>20</b>	<b>9</b>	<b>3</b>
	105	0,000	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	110	0,033	0,015	0,000	0,033	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000
	115	0,050	0,091	0,067	0,033	0,154	0,050	0,089	0,125	0,167	0,167
	120	0,217	0,273	0,167	0,350	0,423	0,450	0,267	0,200	0,278	0,000
	125	0,233	0,136	0,300	0,250	0,308	0,250	0,178	0,225	0,111	0,167
	130	0,217	0,258	0,167	0,233	0,115	0,100	0,211	0,225	0,111	0,167
	135	0,217	0,167	0,233	0,100	0,000	0,100	0,144	0,175	0,333	0,333
	140	0,017	0,045	0,067	0,000	0,000	0,000	0,044	0,025	0,000	0,167
	145	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,011	0,000	0,000
150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,025	0,000	
Ee2 - 407	pHWE	<b>0,792</b>	<b>0,000</b>	<b>0,007</b>	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>	<b>0,103</b>	<b>0,001</b>	<b>0,401</b>	<b>0,128</b>	<b>0,174</b>
	N	<b>30</b>	<b>33</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>45</b>	<b>20</b>	<b>9</b>	<b>3</b>
	152	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	156	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,100	0,011	0,075	0,000	0,000
	158	0,283	0,288	0,167	0,100	0,000	0,250	0,322	0,275	0,278	0,167
	160	0,150	0,091	0,233	0,117	0,346	0,000	0,122	0,200	0,111	0,333
	162	0,217	0,273	0,200	0,250	0,077	0,200	0,189	0,175	0,278	0,000
	164	0,067	0,030	0,033	0,100	0,192	0,150	0,022	0,000	0,056	0,167
	166	0,017	0,015	0,067	0,017	0,000	0,000	0,022	0,025	0,000	0,000
	168	0,167	0,227	0,233	0,117	0,000	0,150	0,222	0,100	0,278	0,000
	170	0,050	0,030	0,000	0,183	0,231	0,150	0,044	0,075	0,000	0,333
	172	0,000	0,015	0,000	0,050	0,077	0,000	0,022	0,025	0,000	0,000
	174	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	178	0,000	0,000	0,000	0,000	0,077	0,000	0,011	0,025	0,000	0,000
	180	0,017	0,015	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	182	0,017	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	186	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000
188	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	
222	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
229	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
Ee2 - 508	pHWE	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,325</b>	<b>0,000</b>	<b>0,007</b>	<b>0,910</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,174</b>
	N	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>45</b>	<b>20</b>	<b>9</b>	<b>3</b>
	118	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167
	121	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000
	127	0,000	0,000	0,000	0,000	0,077	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000
	133	0,000	0,000	0,000	0,017	0,038	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000
136	0,017	0,000	0,000	0,017	0,038	0,000	0,000	0,000	0,111	0,167	

Продолжение Таблицы 13

	137	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000
	142	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,025	0,056	0,000
	147	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025	0,056	0,000
	152	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000
	157	0,050	0,031	0,033	0,067	0,077	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000
	160	0,450	0,313	0,600	0,417	0,346	0,650	0,467	0,400	0,333	0,333
	163	0,083	0,156	0,267	0,383	0,308	0,300	0,178	0,100	0,222	0,000
	166	0,067	0,047	0,000	0,017	0,000	0,050	0,022	0,125	0,000	0,000
	169	0,033	0,203	0,100	0,050	0,000	0,000	0,067	0,100	0,111	0,333
	172	0,017	0,109	0,000	0,000	0,077	0,000	0,022	0,000	0,111	0,000
	175	0,100	0,078	0,000	0,000	0,038	0,000	0,056	0,100	0,000	0,000
	178	0,100	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,044	0,075	0,000	0,000
	181	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	184	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ee2 - 91a	pHWE	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,909</b>	<b>0,000</b>	<b>0,343</b>	<b>0,108</b>	<b>0,423</b>
	N	<b>30</b>	<b>29</b>	<b>8</b>	<b>25</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>43</b>	<b>19</b>	<b>9</b>	<b>3</b>
	257	0,267	0,224	0,375	0,120	0,000	0,100	0,186	0,237	0,167	0,167
	260	0,167	0,207	0,250	0,260	0,192	0,350	0,174	0,132	0,167	0,333
	263	0,117	0,086	0,125	0,040	0,154	0,050	0,151	0,132	0,167	0,167
	266	0,133	0,259	0,000	0,160	0,192	0,150	0,233	0,105	0,333	0,333
	268	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	269	0,117	0,069	0,250	0,260	0,154	0,300	0,186	0,342	0,056	0,000
	272	0,133	0,086	0,000	0,140	0,231	0,050	0,023	0,026	0,111	0,000
	275	0,050	0,069	0,000	0,000	0,038	0,000	0,047	0,026	0,000	0,000

Примечание: красным цветом выделены значения  $pHWE < 0,01$  и подтверждающие отклонение от уравнения Харди-Вайнберга.

Нулевые аллели были выявлены для двух локусов: Ee2-91a и Ee2-508. Это объясняет отклонение от уравнения Харди-Вайнберга для большинства проб по этим выборкам. В ходе анализа были выявлены для половины локалитетов приватные аллели, они приведены в скобках с их частотой: Абхазия – Ee2-407 (174 – 0,017), Ee2-508 (181 – 0,050; 184 – 0,017); Азовское море – Ee2-91b (105 – 0,015); Анапа – Ee2-135 (112 – 0,017), Ee2-483b (218 – 0,018), Ee2-407 (152 – 0,017, 222 – 0,017, 229 – 0,017), Ee2-91a (268 – 0,020); Бартын – Ee2-483b (209 – 0,111; 236 – 0,056); Севастополь – Ee2-135 (230 – 0,011), Ee2-508 (137 – 0,011; 152 – 0,011), Ee2-407 (188 – 0,011); Туапсе – Ee2-508 (118 – 0,167); Синоп – Ee2-407 (186 – 0,025).

Как и для митохондриальной ДНК (*cytb*), полученные значения параметров генетической дифференциации, рассчитанные по данным изменчивости микросателлитных локусов, между географическими точками сбора проб не выявил существенных различий кроме сбора около Туапсе (Таблица 14). Отличия в данной точке объясняются крайне малой выборкой и не являются достоверными.

Таблица 14 – Значения индекса  $F_{ST}$  и генетических дистанций Нею между локалитетами по 7 микросателлитным локусам

Абхазия	Азовское море	Анаклия	Анапа	Барцын	Болгария	Сев-ль	Синоп	Трабзон	Туапсе	
-	<b>0,063</b>	0,081	0,118	0,225	0,138	<b>0,055</b>	0,084	0,147	0,447	Абхазия
0,009	-	0,150	0,130	0,246	0,200	<b>0,058</b>	0,111	0,102	0,434	Азовское море
0,013	0,022	-	0,122	0,272	0,129	0,106	<b>0,096</b>	0,194	0,494	Анаклия
0,017	0,018	0,019	-	0,121	<b>0,072</b>	<b>0,095</b>	0,125	0,146	0,540	Анапа
0,030	0,032	0,039	0,018	-	0,192	0,210	0,210	0,243	0,492	Барцын
0,028	0,037	0,026	0,017	0,035	-	0,135	0,136	0,175	0,581	Болгария
0,008	0,008	0,017	0,014	0,028	0,027	-	<b>0,083</b>	0,118	0,426	Сев-ль
0,012	0,015	0,015	0,018	0,028	0,028	0,012	-	0,154	0,443	Синоп
0,023	0,016	0,031	0,023	0,035	0,033	0,019	0,023	-	0,458	Трабзон
0,062	0,061	0,072	0,075	0,070	0,095	0,061	0,062	0,071	-	Туапсе

Примечание:  $F_{ST}$  под диагональю, генетические дистанции Нею над диагональю

Следует отметить, закономерности между локалитетами и генетической дистанцией нет. Так наименьшие значения генетической дистанции по Нею [Nei, 1987] получены между сильно удаленными районами (в таблице 14 выделены жирным шрифтом). Например, между Болгарией и Анапой значение составляет всего 0,072, а между Болгарией и Севастополем в два раза больше – 0,135. Предполагалось, что особи анчоуса из Азовского моря, в силу его частичной географической изоляции и особенностей нерестовых миграций, будут более дифференцированы от других популяций. Однако, значения генетических дистанций между Азовским морем и другими точками сбора не выделяются. Все значения индекса фиксации Райта меньше 0,039 (если не учитывать 3 особи из

Туапсе), что соответствует низкой генетической дифференциации между всеми локалитетами.

Согласно проведенным ранее работам, мы предполагали наличие нескольких генетически отличающихся популяций хамсы в Азово-Черноморском регионе [Калнин, Калнина, Дашкова, 1984; Калнина, Калнин, 1984; Калнин, Калнина, 1985; Зуев, 2014].

Для того, чтобы выяснить насколько гетерогенна генеральная совокупность мы провели анализ изменчивости 7 микросателлитных локусов методом главных компонент (Рисунок 15). В результате не было выявлено совокупностей, которые бы образовывали отдельные кластеры, все пробы полностью перемешаны.

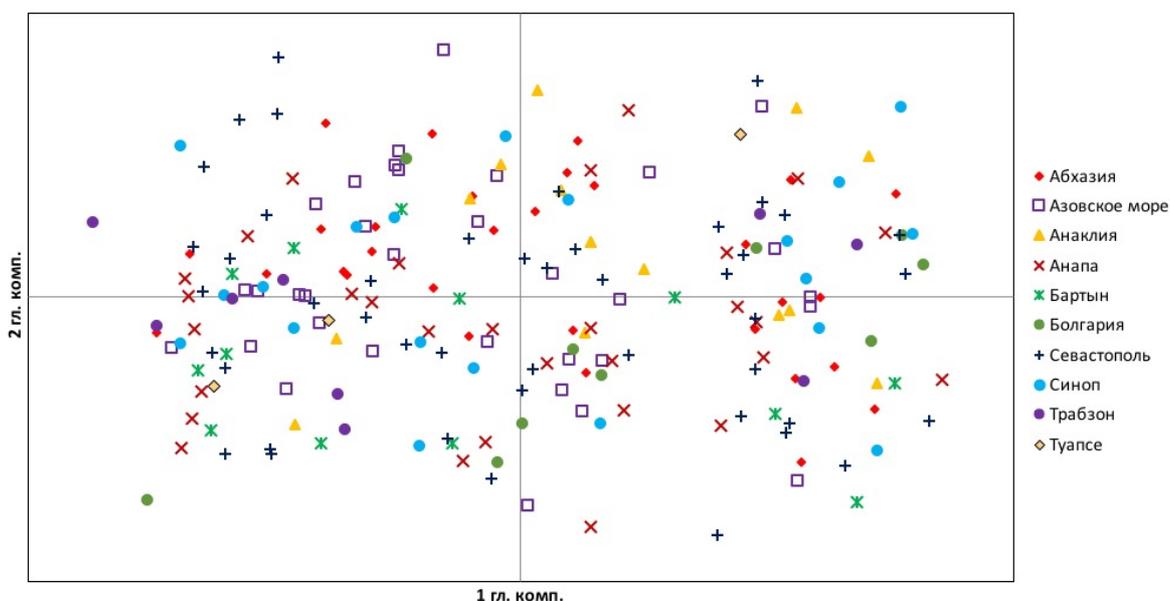


Рисунок 15 – Анализ главных компонент для всех географических точек по 7 микросателлитным локусам.

Кроме того, было решено провести кластеризацию в Structure. Ранее по морфологическим маркерам, степени зараженности паразитами, группам крови и аллозимным маркерам выделялось от двух до семи различающихся группировок (азовский и черноморский подвиды, их гибриды, гибриды со средиземноморским анчоусом, средиземноморский анчоус, «прибрежная» форма, южная популяция черноморского анчоуса), поэтому я тестировала различное число выделяемых

группировок ( $K$  изменялось от 1 до 10). В качестве входящих данных использовались данные об аллелях микросателлитных локусов для каждой особи, на выходе получали две характеристики:  $L(K)$  и  $dK$ . Затем строился график, показывающий изменение этих критериев от заданного числа кластеров (Рисунок 16).

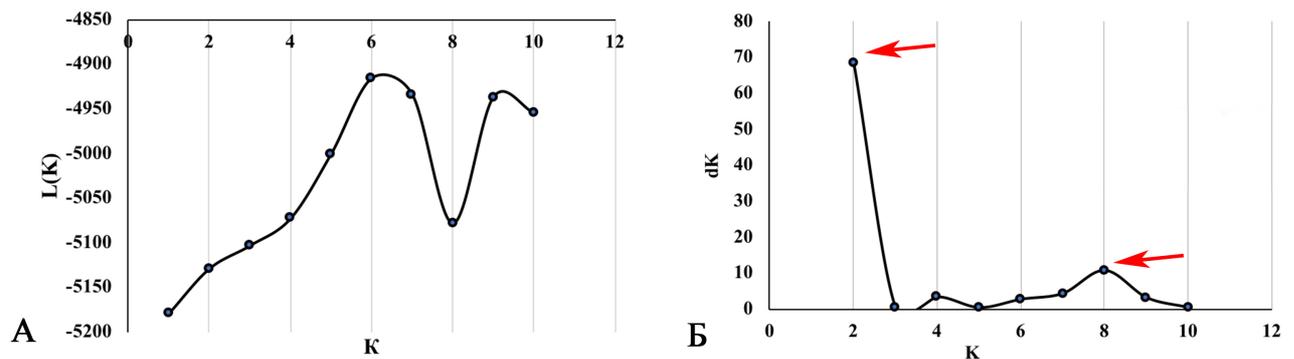


Рисунок 16 – Кривая зависимости  $L(K)$  (А) и  $dK$  (Б)

Результаты анализа показали неоднозначное число кластеров в Азово-Черноморском бассейне, что скорее всего связано со слабой генетической гетерогенностью европейского анчоуса. При проведении анализа в Structure указывалось наличие двух кластеров ( $K=2$ ), использовалась смешанная модель без предварительной информации о локалитетах (Admixture Model). Анализ показал отсутствие генетической дифференциации анчоуса в Азово-Черноморском регионе (Рисунок 17).

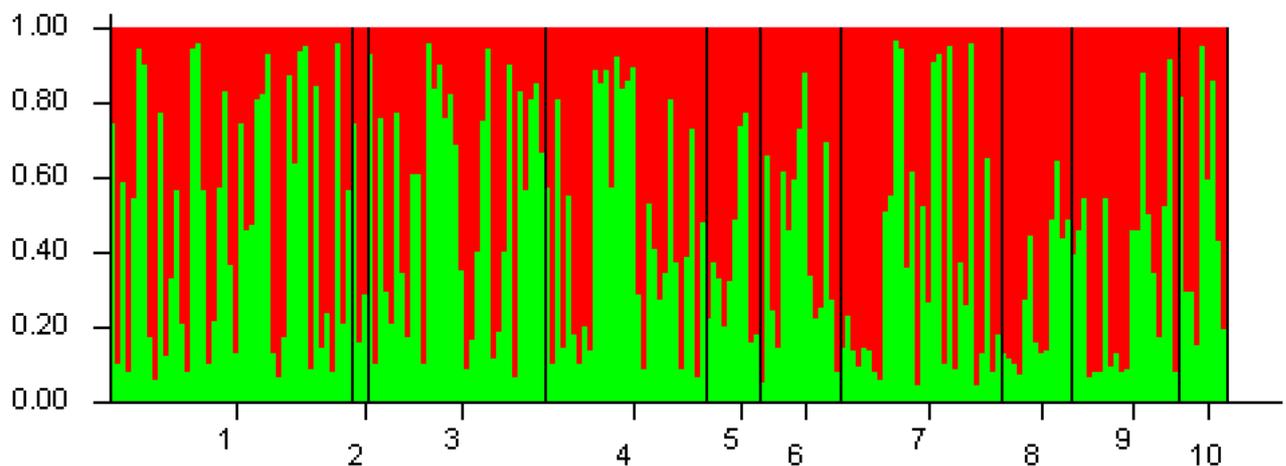


Рисунок 17 – Результаты кластеризации Structure для  $K=2$  (Admixture Model). Цифры обозначают географические точки сбора проб: 1 – Севастополь, 2 – Туапсе, 3 – Азовское море, 4 – Анапа, 5 – Болгария, 6 – Анаклия, 7 – Абхазия, 8 – Бартын, 9 – Синоп, 10 – Трабзон.

Анализ не выявил особей хамсы, которые полностью соответствуют какому-либо кластеру. Все пробы являются смешанными. Кроме того, проведенный анализ может свидетельствовать в пользу того, что существует постоянный поток генов между косяками анчоуса из различных районов Азовского и Черного моря. Географическая изоляция, согласно нерестовым районам, не подтвердилась.

Таким образом, все проведенные тесты на основе митохондриальных и ядерных маркеров показали генетическую однородность между и внутри косяков анчоуса из Азовского и Черного морей. Такая ситуация характерна для видов с большим эффективным размером популяций и высоким уровнем миграций [Waples, 1998].

Кроме изучения генетической дифференциации между различными географическими районами морей, мы провели анализ выборок азовского и черноморского анчоуса. У части проб, для которых проводился анализ микросателлитов, была определена подвидовая принадлежность с помощью морфологических методов. Для дальнейшего анализа изменчивости микросателлитных локусов были исключены особи, для которых не амплифицировались все 8 локусов. Были сформированы соответственно две выборки анчоуса, общий объем проб составил 138. Все параметры, характеризующие генетическое разнообразие двух подвидов представлены в Таблице 15.

Наблюдаемое значение гетерозиготности ниже, чем ожидаемое в обоих выборках. Ни по одному параметру нет достоверных отличий между азовской и черноморской хамсой.

Таблица 15 – Характеристики 8 микросателлитных локусов у азовского и черноморского анчоуса

Локус	Азовская хамса (N=69)				Черноморская хамса (N=69)				F-статистика			Nm	D (Nei)
	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>		
Ee2-508	10	4,106	0,377	0,756	8	3,299	0,232	0,697	0,581	0,582	0,003	79,53	
Ee2-135	10	6,668	0,710	0,850	10	6,758	0,681	0,852	0,183	0,186	0,004	64,31	
Ee2-483b	9	4,145	0,681	0,759	8	4,437	0,623	0,775	0,149	0,152	0,004	70,19	
Ee2-91b	9	5,343	0,826	0,813	8	5,485	0,870	0,818	-0,040	-0,038	0,002	149,28	
Ee2-407	10	4,967	0,725	0,799	13	5,454	0,652	0,817	0,148	0,152	0,005	54,93	
Ee2-477	16	6,645	0,739	0,850	17	6,183	0,855	0,838	0,055	0,058	0,003	87,34	
Ee2-91a	9	5,824	0,362	0,828	7	5,702	0,551	0,825	0,448	0,449	0,003	82,83	
Ee2-165	5	2,561	0,696	0,610	5	2,228	0,536	0,551	-0,061	-0,059	0,002	104,26	
Всего	<b>9,75</b>	<b>5,032</b>	<b>0,639</b>	<b>0,783</b>	<b>9,625</b>	<b>4,988</b>	<b>0,632</b>	<b>0,777</b>	<b>0,183</b>	<b>0,185</b>	<b>0,003</b>	<b>86,58</b>	<b>0,022</b>
	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>	Nm	D (Nei)

Примечания: Na – число аллелей на локус, Ne – среднее эффективное число аллелей, Ho – средняя наблюдаемая гетерозиготность, He – средняя ожидаемая гетерозиготность, F<sub>IS</sub>, F<sub>IT</sub>, F<sub>ST</sub> – значения F-статистики Райта, D (Nei) – генетическая дистанция Нея, Nm – количество мигрантов на поколение.

Крайне низкое значение F<sub>ST</sub> свидетельствует о генетической гомогенности азовского и черноморского анчоуса. Это подтверждается и низким значением генетической дистанции Нея и согласуется с данными, полученными нами на основе изменчивости мтДНК. Анализ генных потоков основывался на количестве мигрантов на поколение, которое рассчитывалось на основе статистики Райта. Высокие значения Nm свидетельствуют о непрекращающихся миграциях между подвидами и, как следствие, высоком потоке генов. Что вероятно и обуславливает отсутствие генетической дифференциации.

Графики распределения частот аллелей по восьми локусам также демонстрируют отсутствие различий (Рисунок 18). Только несколько локусов дают видимые различия (указаны стрелками). Однако, данных отличий недостаточно для генетической дифференциации двух подвигов. На графиках приведены значения p, показывающие отсутствие достоверных различий для каждого локуса

при сравнении групп азовского и черноморского анчоуса с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

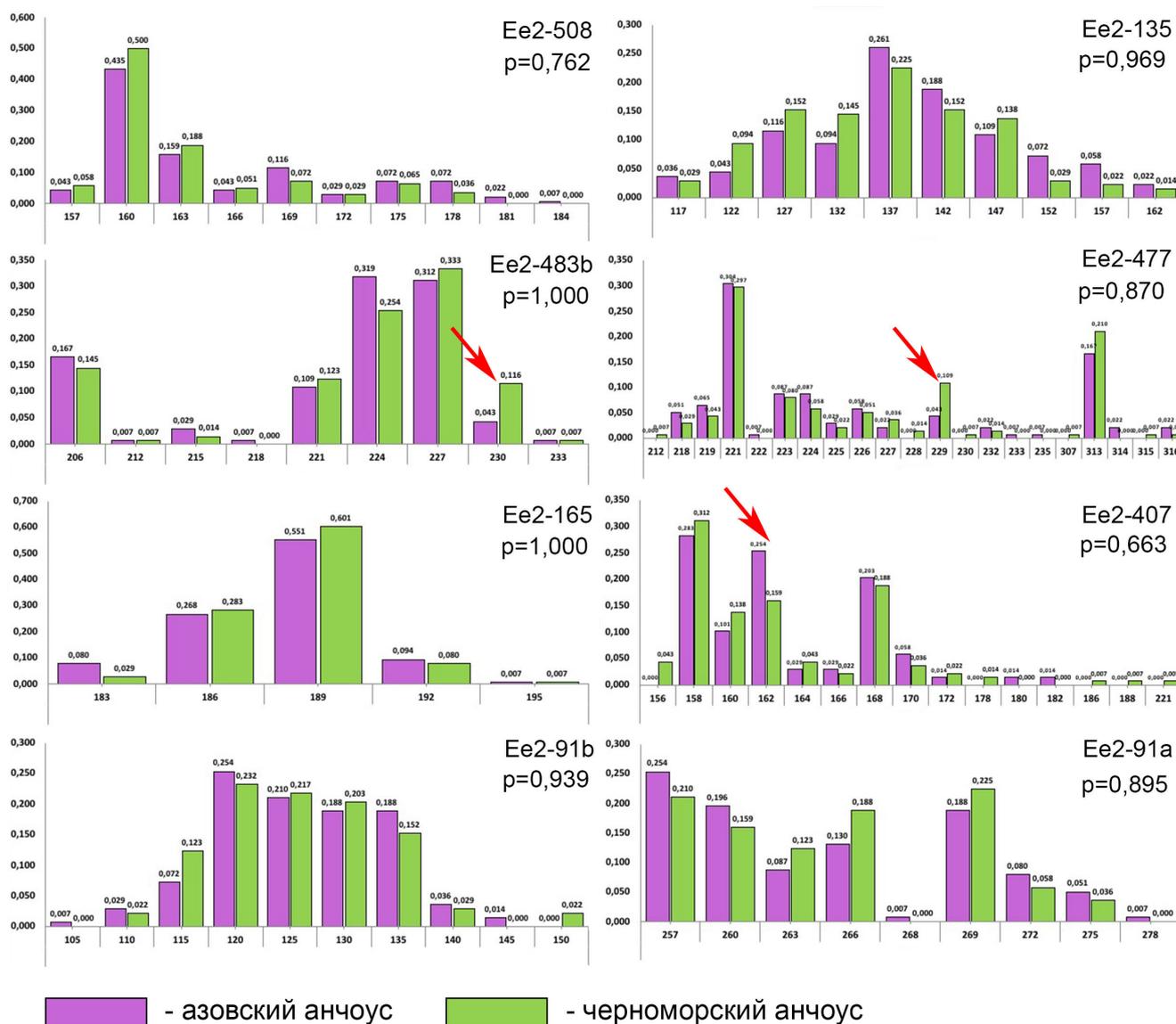


Рисунок 18 – Распределение частот аллелей для восьми микросателлитных локусов у двух подвигов европейского анчоуса в Азово-Черноморском регионе. Красные стрелки указывают те аллели, по частотам которых отличаются азовский и черноморский анчоус.

Отсутствие дифференциации двух подвигов по микросателлитным локусам демонстрирует и проведенный анализ методом главных компонент (Рисунок 19), который не выявил кластеров.

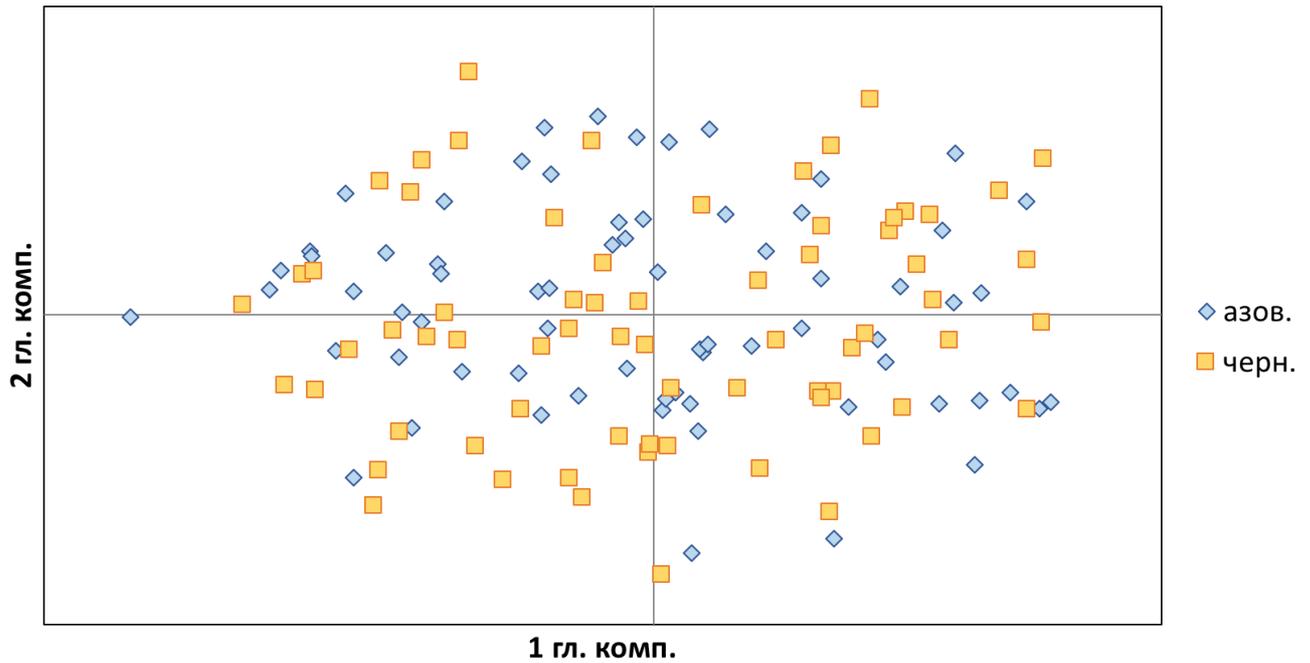


Рисунок 19 – Анализ главных компонент для двух подвигов анчоуса в Азово-Черноморском бассейне по 8 микросателлитным локусам.

Мы также провели анализ распределения кластеров по микросателлитным локусам между двумя подвидами анчоуса. В данном случае использовалась модель с предварительной информацией о подвиговой принадлежности. Как и в случае анализа по географическим точкам, результаты Strucutre не позволяют однозначно судить о числе кластеров (Рисунок 20) и подтверждают отсутствие какой-либо генетической дифференциации азовского и черноморского анчоусов (Рисунок 21).

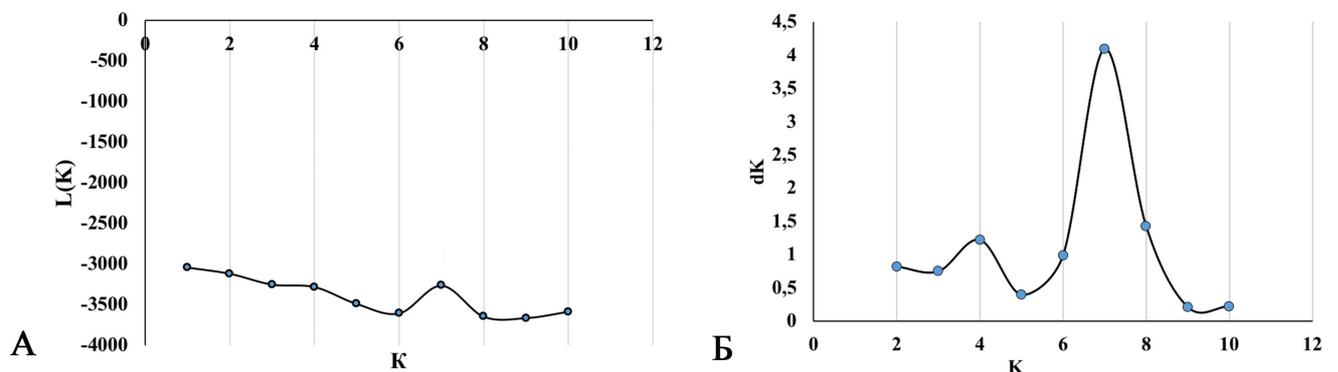


Рисунок 20 – Кривая зависимости  $L(K)$  (А) и  $dK$  (Б)

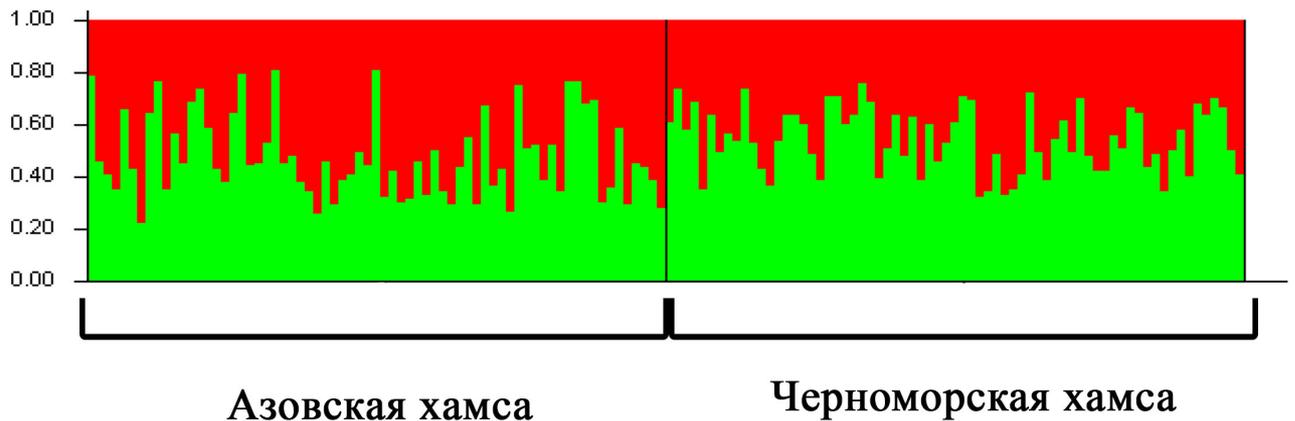


Рисунок 21 – Результаты кластеризации Structure для  $K=2$  (Admixture Model with LockPrior) у 138 особей по 8 микросателлитным локусам

В тоже время, проведенный морфологический анализ отолитов данных выборок демонстрирует различия (Рисунок 22). Как упоминалось выше, диапазоны значений индекса отолита ( $l/d$ ) для двух подвидов имеют сильное перекрывание. Однако, угол отолита (разработанный нами) показывает достоверные различия азовского и черноморского анчоуса.

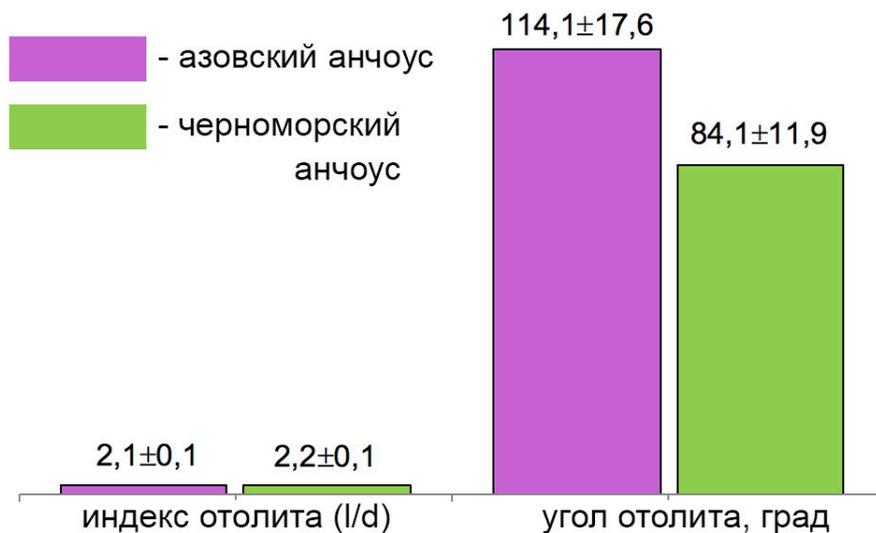


Рисунок 22 – Средние значения морфологических характеристик отолитов для азовского и черноморского анчоуса

### ***3.1.3. Анализ причин несоответствия генетической и морфологической изменчивости***

Как отмечалось ранее, выделяемые подвиды анчоуса в Азово-Черноморском регионе нерестятся и нагуливаются в различных районах бассейна. Так скопления азовской хамсы встречаются в северо-западной части Черного моря и Азовском море, в то время как черноморская хамса нереститься в центральной части Черного моря. Мы предполагаем, что одной из причин, приводящей к несовпадению по генетическим и морфологическим маркерам азовского и черноморского анчоуса, являются различия в гидрохимических и гидрологических характеристиках мест нереста и нагула. Известно, что соленость, температура, кормовая база могут оказывать влияние на скорость роста, темп роста или некоторые морфометрические характеристики, особенно в первый год жизни.

Ниже представлены характеристики Черного и Азовского морей, взятые из литературных данных, по двум основным гидрологическим параметрам: температура и соленость (Рисунок 23) ([https://geographyofrussia.com/category/ya/geografiya-rossii/\\_priroda-rossii/morya-rossii/](https://geographyofrussia.com/category/ya/geografiya-rossii/_priroda-rossii/morya-rossii/)).

Для того чтобы оценить влияние этих двух характеристик на форму отолитов, был проведен непараметрический корреляционный анализ Спирмена для индекса и угла отолита и двух факторов (температура и соленость). Так как мы предполагаем влияние в период нереста и нагула, то были рассмотрены только нерестовые группы (пробы анчоуса, собранные с мая по сентябрь) (Таблица 1).

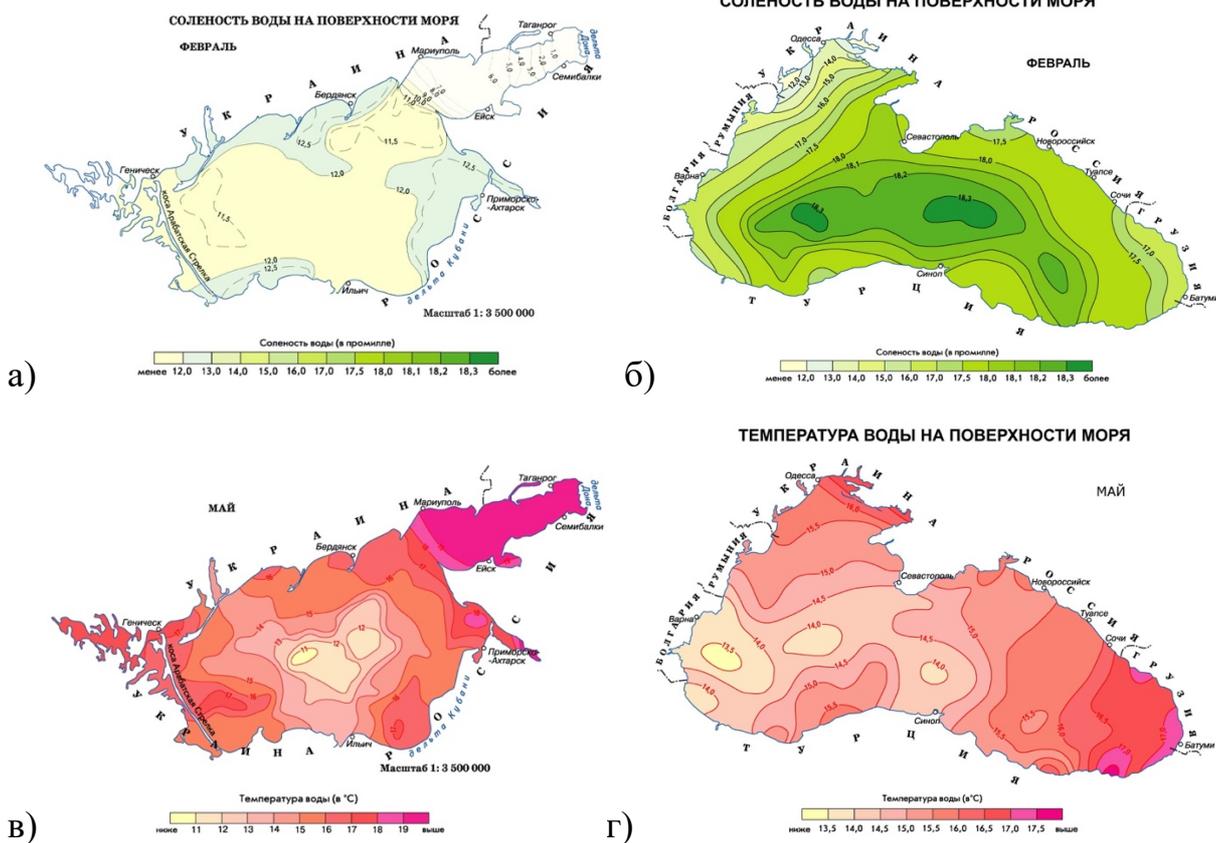


Рисунок 23 – Температурный и соленостный режимы Азовского (а, в) и Черного (б, г) морей

Всего было проанализировано 174 особи хамсы. Анализ показал отсутствие корреляции между индексом отолитов и внешними факторами ( $p > 0,1$ ). В то же время была установлена достоверная слабая положительная корреляция между углом отолитов и температурой ( $R = 0,26$ ,  $p < 0,001$ ) и слабая отрицательная корреляция между углом отолитов и соленостью ( $R = -0,34$ ,  $p < 0,0001$ ). На Рисунке 24 показаны средние значения угла отолита по географическим точкам с различными условиями солености.

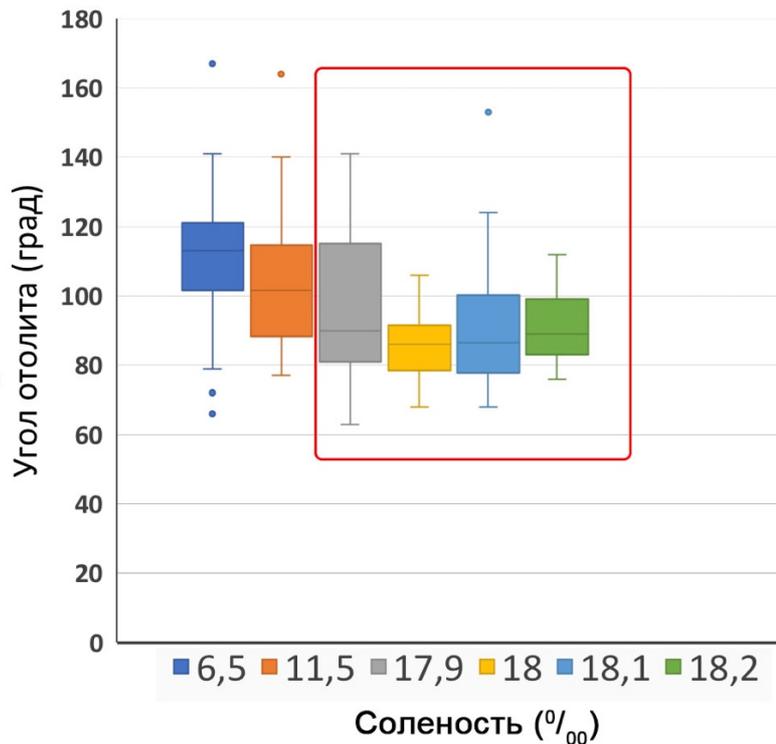


Рисунок 24 – Диапазоны значений углов отолита у нерестовых группировок анчоуса из точек с разными соленостными режимами. Красной рамкой показаны пробы из Черного моря, собранные вдоль берегов Кавказа и Турции.

В целом наблюдается отрицательная тенденция между углом отолита и соленостью бассейнов. Особенно выделяется проба хамсы, собранная в заливе Таганрог (соленость 6,5 ‰). Тут практически отсутствуют особи с низкими значениями углов, которые характерны для черноморской хамсы. Проба из Азовского моря ближе к Керченскому проливу (11,5 ‰) уже является смешанной. Такая же ситуация и с пробой около берегов Грузии (17,9 ‰). Пробы хамсы около берегов Турции имеют более низкие значения. Возможные причины слабой корреляции будут обсуждаться в следующей главе.

## 3.2. Изменчивость митохондриальной ДНК на протяжении всего ареала европейского анчоуса

### 3.2.1. Распределение двух митохондриальных линий европейского анчоуса

Как упоминалось выше (глава 1), для европейского анчоуса на основе данных рестрикционного анализа и изменчивости отдельных митохондриальных генов, были выделены две линии с уровнем дивергенции 1,5%, которые представлены на всем ареале вида. Построенное филогенетическое дерево с использованием 102 сиквенсов из Генбанка и 84 сиквенсов для анчоуса из Азовского и Черного морей, полученных нами, подтвердило наличие двух клад у европейского анчоуса (Рисунок 25). Все пробы анчоуса из Азово-Черноморского региона попали в кладу А, при этом отдельной подгруппы не сформировали. Значения бутстреп поддержек не позволяют выделить какую-либо структуру внутри клад.

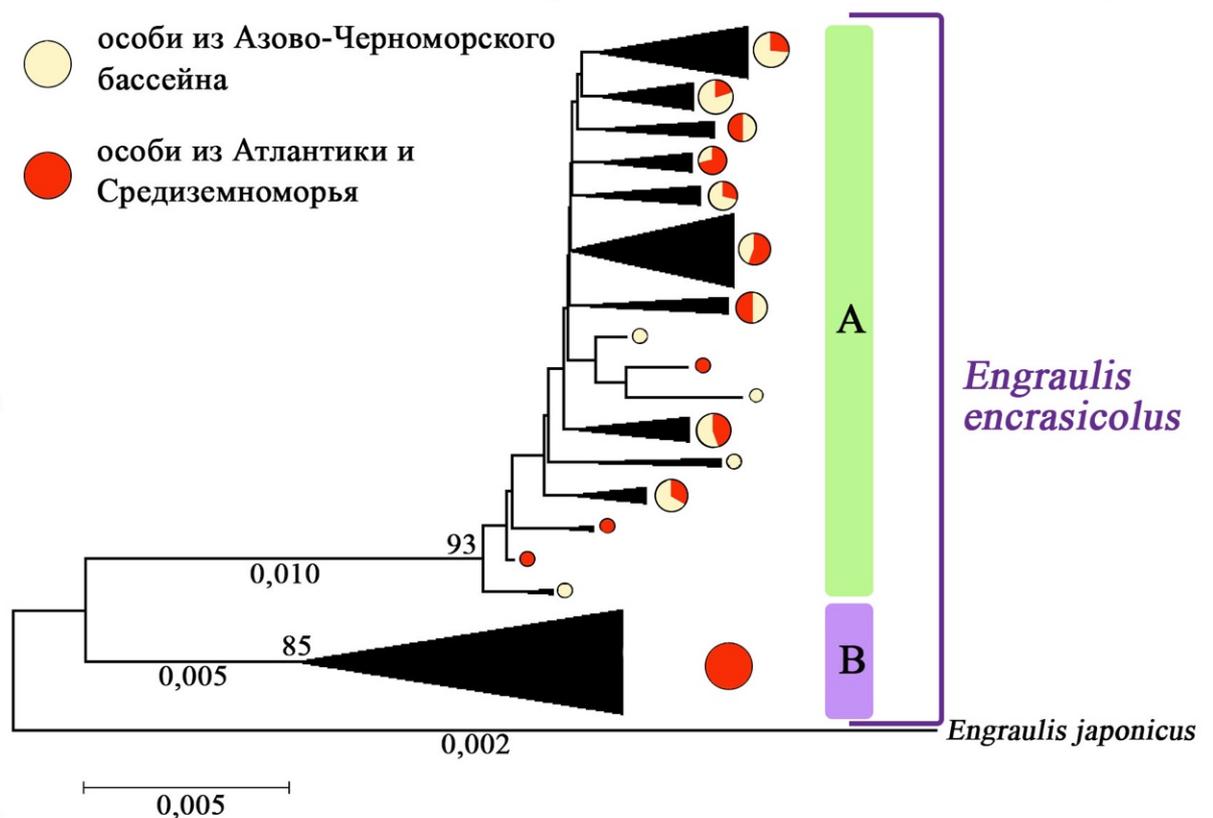


Рисунок 25 – Филогенетическое дерево на основе изменчивости *cytb*. Построение проводилось методом «ближайшего соседа» (NJ) с бутстреп тестом в

1000 репликаций. Величина треугольников пропорциональна числу особей. Круги демонстрируют соотношение особей из Азово-Черноморского бассейна (желтый цвет) и из Атлантики и Средиземноморья (красный цвет). Цифры у узлов – бутстреп поддержка. Длины ветвей в соответствии с масштабом.

Сделан сравнительный анализ литературных данных встречаемости гаплотипов, характерных для двух клад, в Средиземноморском и Атлантическом бассейнах [Grant, 2005; Magoulas et al., 2006; Oueslati et al., 2014; Silva et al., 2014;] и наших данных о принадлежности европейского анчоуса из Азовского и Черного морей к митохондриальной линии А. Результаты нанесены на карту (Рисунок 26) в виде соотношения частот встречаемости гаплотипов клад А и В. Рассмотрено 36 географических районов, которые охватывают весь ареал.

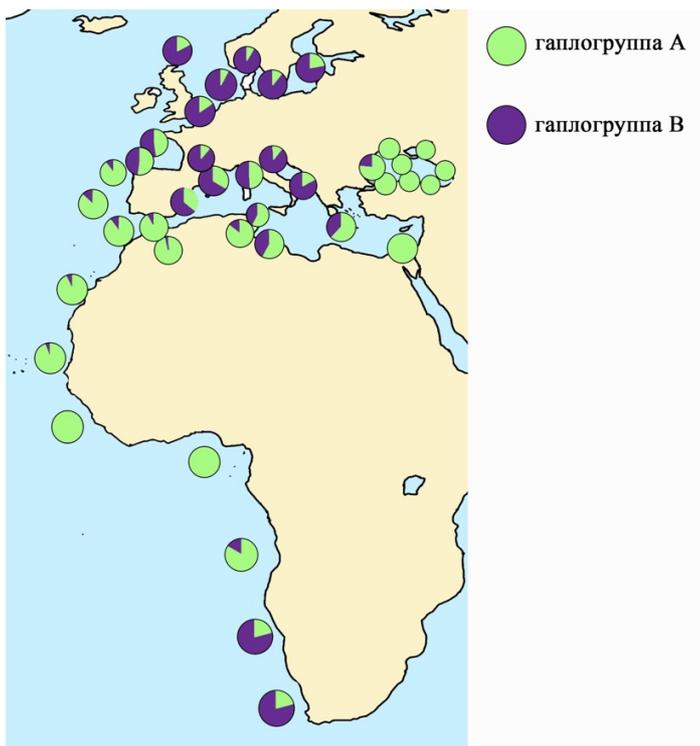


Рисунок 26 – Распределение частот гаплотипов, характерных для двух митохондриальных линий А и В

Согласно полученным данным, распределение двух митохондриальных линий имеет определенную географическую направленность. На севере и юге

Атлантического океана преобладает клада В, с приближением к экватору картина изменяется в противоположную сторону. Такая же ситуация наблюдается в Средиземноморском бассейне: на севере превалирует филогруппа В, на юге – А. Однако в Черном и Азовском морях линия В представлена крайне слабо и встречается только около берегов Болгарии.

### 3.2.2. Связь филогеографической структуры с гидрологическим режимом

Наличие определенной закономерности в распределении митохондриальных линий может говорить о возможной связи с гидрологическими характеристиками бассейнов. Для проверки данной гипотезы мы провели регрессионный и корреляционный анализ по пяти гидрологическим параметрам: температура, соленость, концентрации кислорода, фосфатов и нитратов.

Отмечено изменение некоторых из этих параметров с глубиной, а также выделены определенные географические зоны, для которых значения условий среды отличаются от других (Рисунок 27).

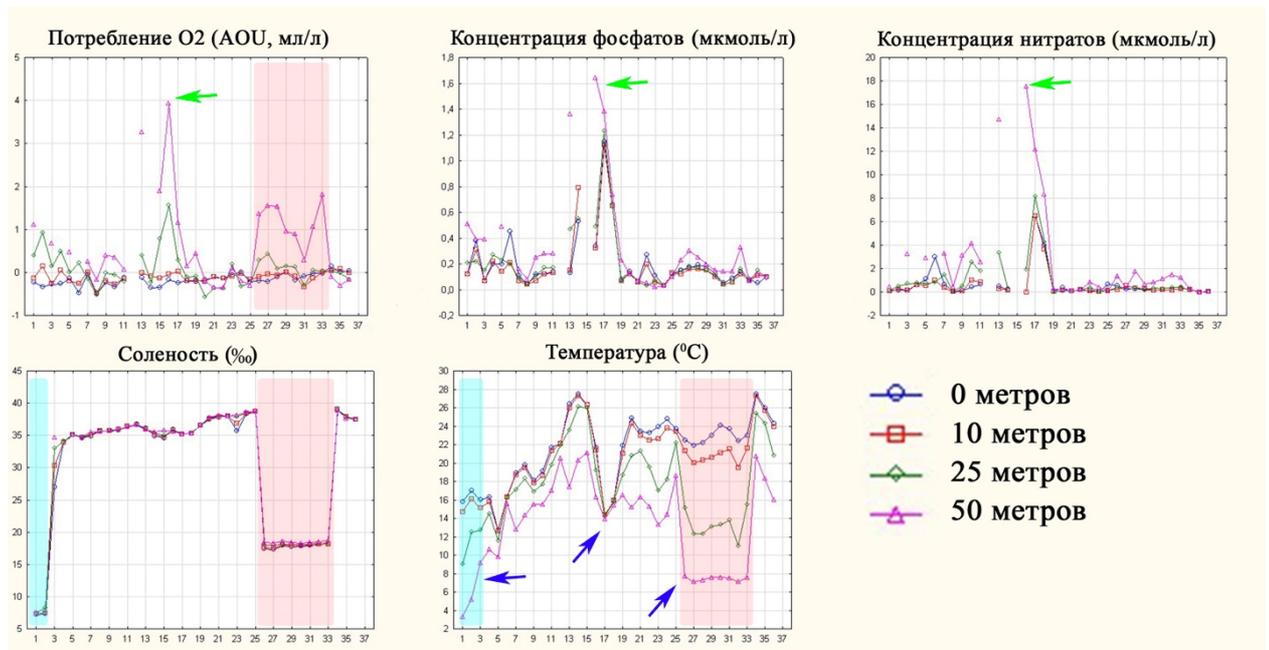


Рисунок 27 – Изменение гидрологических параметров с глубиной

Около западного побережья Африки резкое изменение концентрации кислорода, нитратов и фосфатов на глубине ниже 25 м (зеленые стрелки). В Балтийском море, у южного мыса Африки и в Азово-Черноморском бассейне на глубине 25 м температура опускается ниже 12 °С (синие стрелки). Низкие значения солености в Азово-Черноморском бассейне (выделен розовым прямоугольником) и Балтийском море (выделен голубым прямоугольником) по сравнению с другими районами. В Азово-Черноморском бассейне происходит уменьшение концентрации кислорода с глубиной. Наибольшая стратификация по температуре характерна для Азово-Черноморского региона: в верхних слоях температура, характерная для теплого Средиземноморья и экваториальных вод Атлантики, на глубине она падает до значений, характерных для холодных вод севера и юга Атлантики.

Непараметрический корреляционный анализ выявил наличие линейной зависимости только между частотами клад и температурой (на глубинах 0 и 10 м) (коэффициенты Спирмена соответственно 0,291, 0,278,  $p < 0,05$ ). Между частотами клад и другими гидрологическими факторами линейной корреляции не обнаружено. Непараметрический тест Крускала-Уоллиса (H-тест) и медианный тест показали достоверную зависимость распределения частоты гаплотипов двух клад от двух гидрологических факторов: солености и температуры (Таблица 16).

Изменение соотношения частот клад А и В не имеет четкой зависимости от температуры (Рисунок 28). Колебания температуры в зависимости от месяца сильнее чем колебания частот гаплогрупп, поэтому в данном контексте можно говорить не о строгой зависимости, а о тенденции. Были обнаружены некоторые противоречия в распределении частот. В точках с 1 по 10 преобладают особи клад В и данный район характеризуется в целом более низкой температурой. В тоже время в точках 60 – 62 с такой же температурой клада В не обнаружена.

Таблица 16 – Результаты тестов наличия зависимости частоты гаплотипов от различных гидрологических характеристик

Пар-ры	T (0 м)	T (10 м)	T (25 м)	T (50 м)	O <sub>2</sub> (10 м)	S (10 м)	N (0 м)
N/df	69/6	69/6	68/6	64/4	60/6	68/2	44/5
H	14,73*	14,01*	15,66*	16,64**	6,22	17,93**	4,69
$\chi^2$	7,81	8,66	8,42	10,67*	7,73	10,62**	2,47
Пар-ры	N (10 м)	N (25 м)	N (50 м)	Ph (0 м)	Ph (10 м)	Ph (25 м)	Ph (50 м)
N/df	44/5	45/5	37/5	50/5	48/5	49/5	44/4
H	3,24	3,13	2,75	2,98	3,77	6,32	4,32
$\chi^2$	4,49	2,68	3,89	2,51	3,60	3,58	2,52

Примечание: N – число точек, df – число степеней свободы, H – значение коэффициента Крускала-Уоллиса,  $\chi^2$  – значение хи-квадрата для медианного теста, \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ .

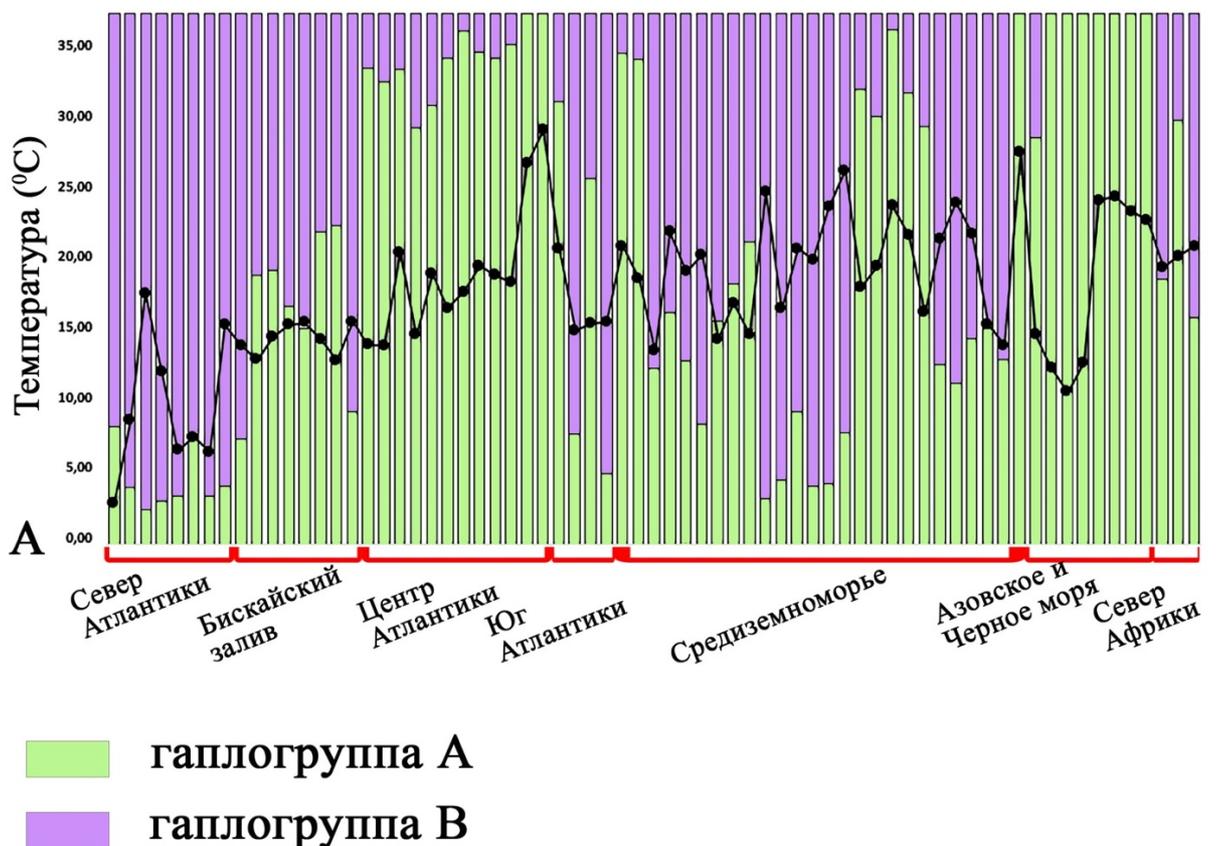


Рисунок 28 – Зависимость частоты гаплотипов клад А и В от температуры (на глубине 10 м)

Несоответствие наблюдается и при анализе изменения соотношения частот клад в зависимости от солености: две зоны с низкой соленостью характеризуются наличием различных митохондриальных линий (Рисунок 29). Однако данное противоречие исчезает, если мы рассматриваем только нерестовые скопления европейского анчоуса.

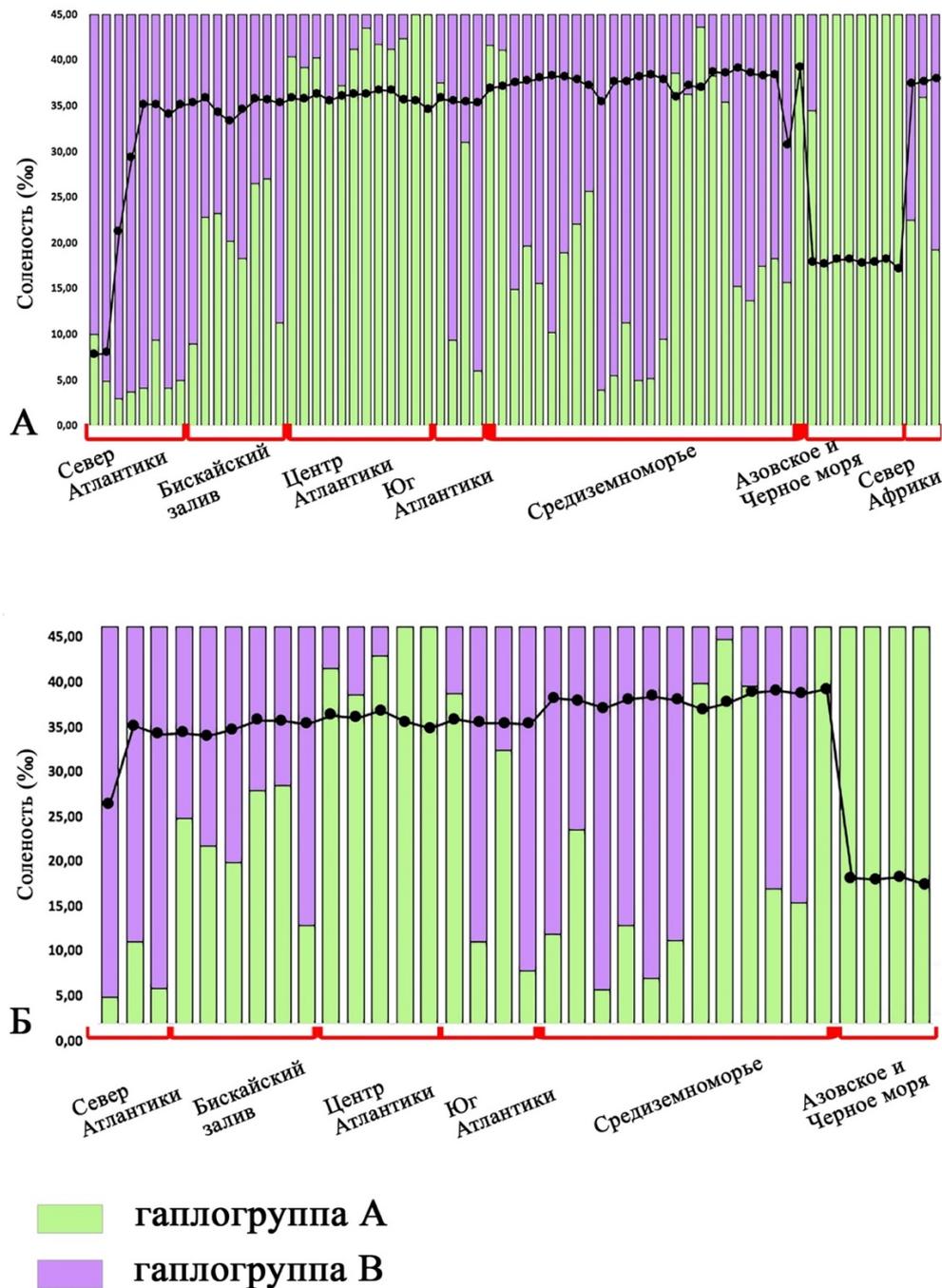


Рисунок 29 – Зависимость частоты гаплотипов клад А и В от солености (на глубине 10 м) для всех скоплений (А) и для нерестовых (Б)

Явной зависимости на графике не наблюдается и это подтверждается отсутствием линейной зависимости (о чем говорилось выше). При высоких значениях солености в выборках присутствуют обе гаплогруппы и их соотношение колеблется. Однако, непараметрические тесты выявили достоверную зависимость между частотой клад и соленостью (Таблица 16). Это объясняется тем, что в условиях низкой солености в нерестовых группах отсутствуют представители гаплогруппы В.

Таким образом, выявлено два основных гидрологических параметра (температура и соленость), которые наиболее вероятно будут оказывать влияние на распределение двух митохондриальных линий по всему ареалу.

### ***3.2.3. Моделирование экологических ниш и географическое распространение европейского анчоуса***

На основе данных распределения гаплогрупп и данных о гидрологических условиях бассейнов, с помощью программы MaxEnt мы провели моделирование экологических ниш для двух митохондриальных линий европейского анчоуса по всему ареалу. Цель данного подхода в выявлении основных параметров, оказывающих максимальное влияние на распределение гаплогрупп. Были взяты следующие параметры: профили, кривизна, наклон и вогнутость шельфа, среднегодовая температура и соленость, диапазон температуры и солености, среднее значение температуры в теплые месяцы, среднее значение температуры в холодные месяцы.

Результаты моделирования даны в Таблице 17. Наибольшее влияние на распространение оказывают среднегодовые значения температуры и солености и их диапазон. Остальные параметры влияют незначительно, однако если их убрать качество модели падает. Вклад каждой величины в модель рассчитывался двумя способами.

Следует отметить, что для нерестовых скоплений увеличивается влияние среднегодового значения солености (bio8). При этом большее влияние соленость оказывает на распространение особей из клады В (вклад составляет почти 10% в нерестовых скоплениях). Данные результаты согласуются с найденной зависимостью по непараметрическим тестам.

Таблица 17 – Значение вклада каждого фактора в модель

Выборка		Все скопления				Только нерестовые скопления			
Клады		А		В		А		В	
Факторы		І способ	ІІ способ	І способ	ІІ способ	І способ	ІІ способ	І способ	ІІ способ
Хар-ка шельфа	bio1	1	0,3	1,4	1,9	0,5	1,7	2,9	5
	bio2	0,5	0,5	0,6	0,2	1,4	1,7	3,6	1,6
	bio6	1,7	1,1	1,6	0,2	1,3	1,1	4,9	1,2
Сол-сть	bio8	4,9	5,5	3,2	2	8,7	3,2	9,9	7,8
Темпер-ные хар-ки	bio11	15,8	40,2	15,8	32,9	18,5	18	10	14,4
	bio13 / bio15	25,5	45,4	28,7	58,2	18,2	34,6	21,9	46
	bio16	50,6	7	48,6	4,6	51,3	39,7	47	24

Примечания: все значения даны в %

Полученные графики кривых отклика, представленные на Рисунке 30 демонстрируют различные диапазоны значений температуры и солености для предсказанной пригодности местообитания с учетом всех скоплений.

Модель с использованием только нерестовых скоплений анчоуса выдает отличающиеся кривые отклика для солености у двух гаплогрупп: происходит резкое сужение диапазона в область более высоких значений для группы В. Кривые отклика, характеризующие благоприятные диапазоны температуры и солености для нерестовых скоплений представлены на Рисунке 31.

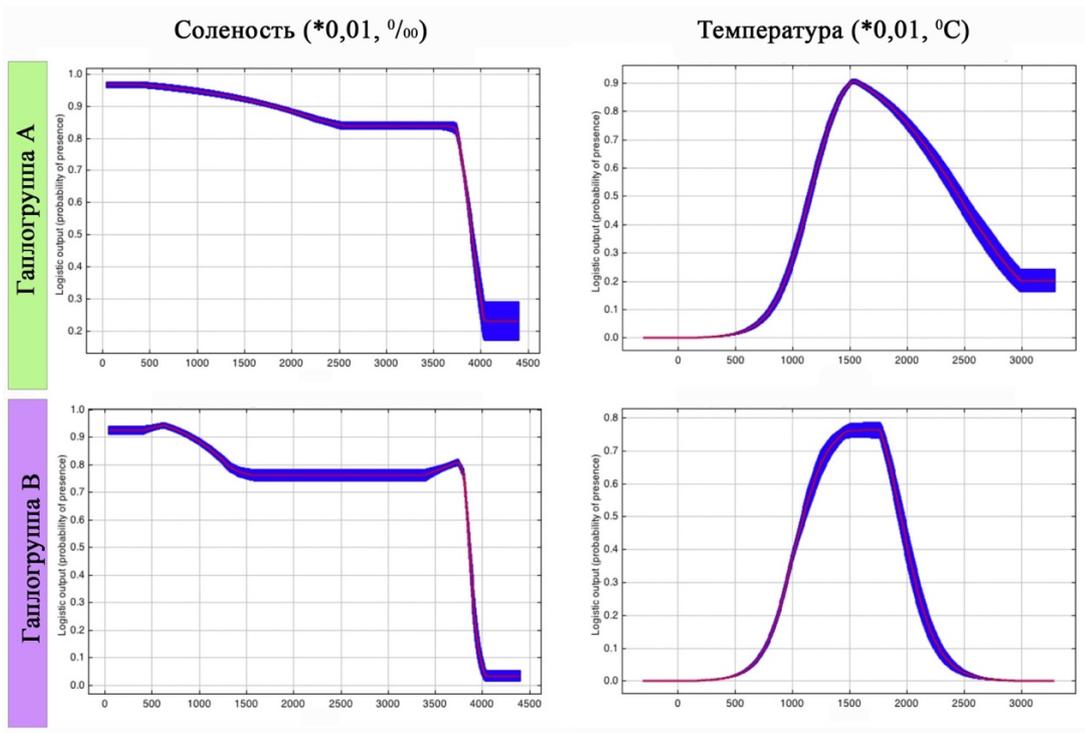


Рисунок 30 – Кривые отклика для солености и температуры для двух гаплогрупп А и В с учетом всех скоплений

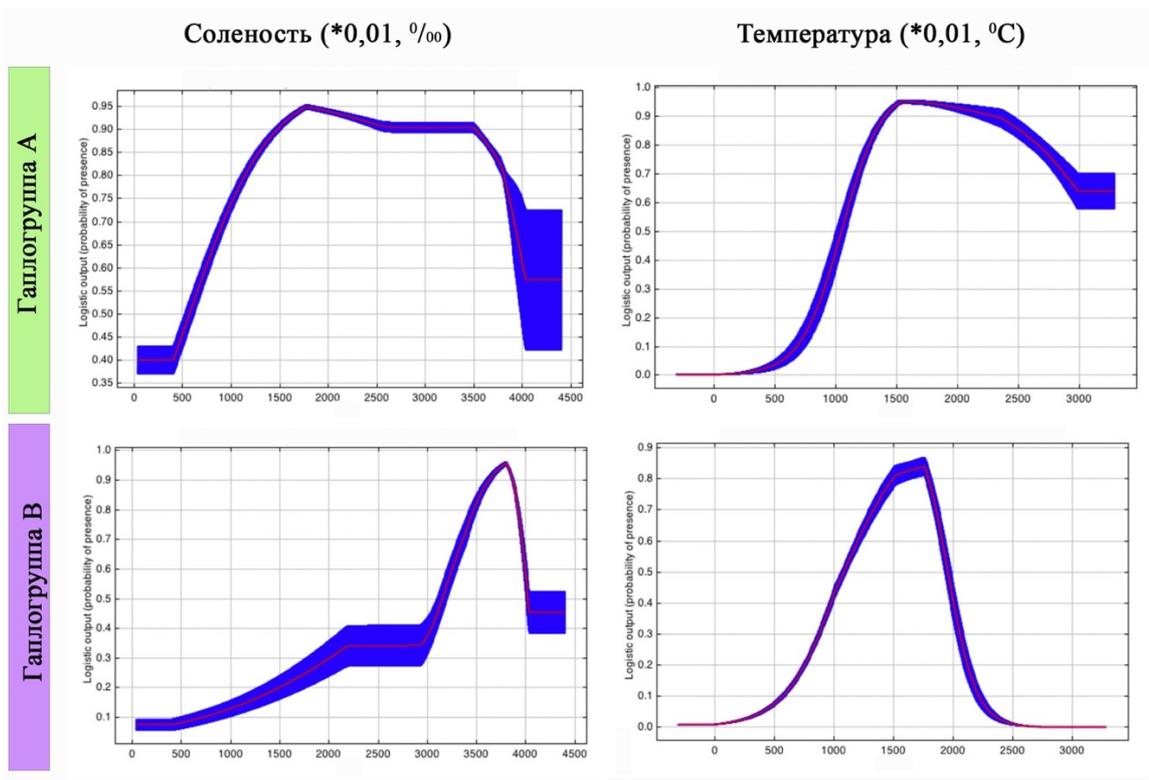


Рисунок 31 – Кривые отклика для солености и температуры для двух гаплогрупп А и В с учетом только нерестовых скоплений

Получены карты, демонстрирующие промоделированные экологические ниши для двух митохондриальных линий с расчетной вероятностью подходящих условий на всем ареале (Рисунок 32).

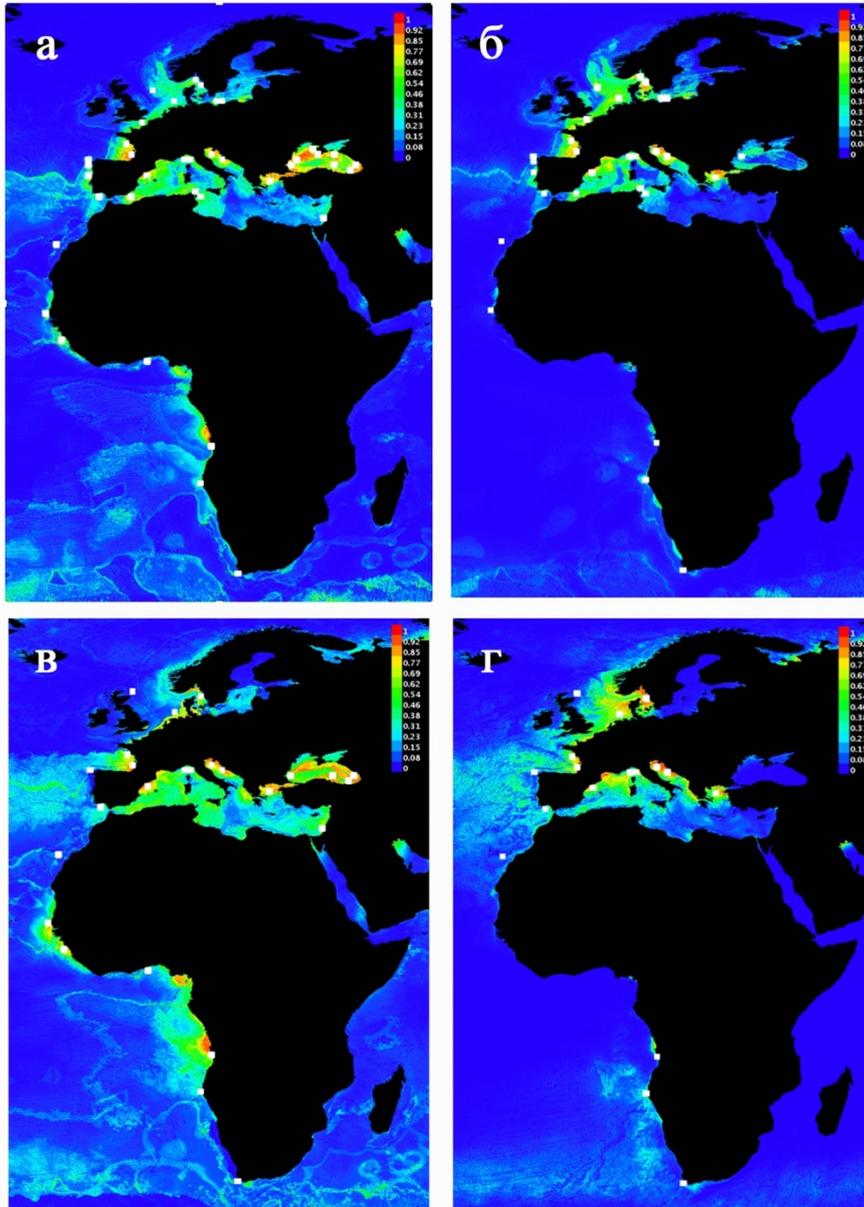


Рисунок 32 – Моделирование в Maxent географического распространения клады А: все скопления (а) и нерестовые (в) и клады В: все скопления (б) и нерестовые (г). Цветная шкала показывает степень комфортности условий для обитания вида от неприемлемых (синий цвет) до наиболее комфортных (красный цвет).

Также проведено моделирование экологических ниш двух клад на основе палеоклиматических данных для временных срезов в 6 и 21 тысячу лет назад

(соответствующие карты представлены на Рисунках 33 и 34). На рисунках показана реконструкция благоприятных мест для распространения двух клад европейского анчоуса на двух временных промежутках.

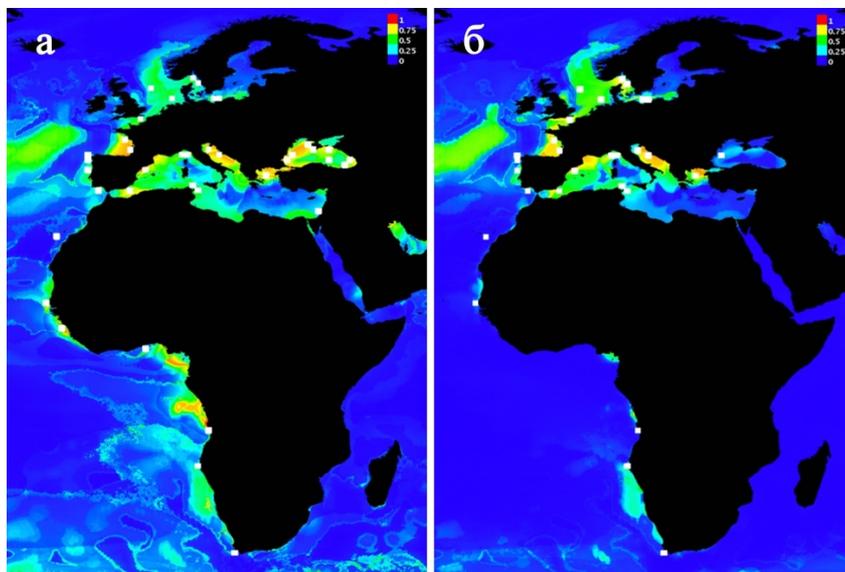


Рисунок 33 – Моделирование в Maxent географического распространения клад А (а) и В (б) 6 тысяч лет назад

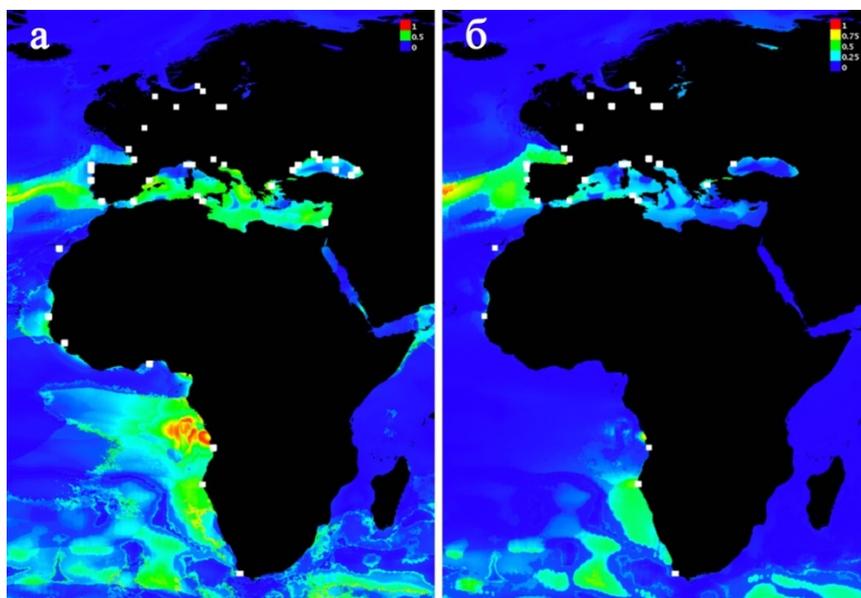


Рисунок 34 – Моделирование в Maxent географического распространения клад А (а) и В (б) 21 тысячу лет назад

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. О выделении подвидов европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне

Как мы уже отмечали в первой главе, на всем ареале в настоящее время признается всего два подвида европейского анчоуса (азовский и черноморский), которые обитают в Азово-Черноморском бассейне. Ни в Атлантике, ни в Средиземноморье подвидовые формы не выделяют, хотя данные регионы имеют такую же степень изолированности как Азовское и Черное моря. При этом, Атлантический и Средиземноморский бассейны имеют гораздо большую площадь, что могло бы являться причиной для образования экологических групп с определенной степенью изоляции. Действительно, в различных работах упоминается о двух экологических формах: прибрежной и океанической, которые имеют фенотипические отличия. Для этих форм были показаны небольшие различия и по микросателлитным локусам, однако из-за больших зон симпатрии вопрос о выделении их в подвиды никогда не ставился.

Использование митохондриальных маркеров никаких межпопуляционных отличий не выявило. Также нет соответствия между фенотипическими формами и изменчивостью митохондриальных генов цитохрома *b* или цитохром-оксидазы. Были обнаружены две митохондриальные линии с генетическими отличиями по различным данным от 1,5 до 4 %, представленные на всем ареале европейского анчоуса. Работы на более «быстрых» ядерных маркерах (различные гены или микросателлитные локусы) проводились на различных частях ареала. В некоторых случаях выявлялись группы из различных частей ареала, которые имели генетическую дивергенцию. Были найдены отличия между прибрежной и океанической формой, данная работа была выполнена на небольшом участке ареала у юга Франции в северо-западной части Средиземного моря [Borsa, Collet, Durand, 2004]. Более поздняя работа, которая охватывала также юг Средиземного моря и Бискайский залив, выявила отличия в изменчивости микросателлитов у

лагунных форм, однако достоверных отличий между различными бассейнами (Атлантика и Средиземноморье) авторы не выявили [Oueslati et al., 2014]. Также не было выявлено отличий по микросателлитным локусам между Бискайским заливом и Адриатическим морем [Borrell et al., 2012]. Данные по белковому полиморфизму также показали, что дивергенция между бассейнами меньше, чем между нерестовыми группами из одного региона [Sanz et al., 2008]. В большинстве работ, показывающих генетическую дифференциацию популяций внутри бассейнов, анализ основывался на изменчивости микросателлитных локусов. Наиболее вероятно, что генетическая дифференциация возникает благодаря превалированию хоминга, быстрой смене поколений (хамса является короткоциклическим видом – не более 4 лет), и времени для фиксации отличий между популяциями с различными нерестилищами по данным маркерам достаточно. Этого не происходит на уровне митохондриальной ДНК из-за более медленной скорости мутирования [Ballard, Whitelock, 2004] и глобальных миграций. Данная гипотеза может объяснить наблюдаемую однородность внутри каждой митохондриальной линии и наличие отличий по более «быстрым» маркерам.

Основываясь на вышесказанном, в ходе работы была исследована внутривидовая структура европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне не только с использованием мтДНК, но и с помощью микросателлитных локусов. Предполагалось, что, как и для Атлантического и Средиземноморского бассейнов, в Азово-Черноморском регионе будет показана генетическая дифференциация между популяциями, которые нерестятся в различных районах этих морей. Такие данные могли бы подтвердить обоснованность выделения подвидов на основе морфологических отличий на столь небольшой части ареала.

Мы использовали общепринятый критерий идентификации подвидов (индекса отолитов) и новый, разработанный нами, дополнительный критерий (угла отолитов) и получили соотношения азовского и черноморского анчоуса в каждой точке (Таблица 9). Тенденция в преобладании одного из подвидов действительно существует: на юге Черного моря преобладает черноморская хамса, на северо-

западе Черного моря и в Азовском море преобладает азовская хамса. Однако было показано огромное количество практически равнозначных смешанных скоплений, особенно во время зимовальных миграций, что показано на Рисунке 11.

Полученные нами результаты по молекулярным маркерам показали отсутствие генетической дифференциации во всем Азово-Черноморском бассейне. Мы ожидали, что данные подвиды будут обладать определенной степенью дивергенции, так как для каждого подвида анчоуса (азовского и черноморского) характерны пространственно обособленные репродуктивные области. Согласно этому предположению, более однородные по подвиговому составу группировки хамсы должны обладать более низкой нуклеотидной изменчивостью мт гена *cytb* по сравнению со смешанными скоплениями. Однако, для всех выборок значения нуклеотидной изменчивости не отличаются (Таблица 10). При этом, данный параметр не изменяется и при объединении всех выборок. Такая картина может свидетельствовать об отсутствии генетической дифференциации двух подвидов европейского анчоуса: *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus*.

Отсутствие дивергенции демонстрируют и крайне низкие значения генетических расстояний между однородными группами анчоуса: Азовское море – все пробы, по морфологическим данным, представлены азовским подвидом, пробы из южной части Черного моря (район Босфора, Трабзона, Синопа) – черноморским. Значение  $D_{xy}$  соответственно 0,0054, 0,0059, 0,0050 (Таблица 11).

Между особями из различных географических районов происходит достаточно сильный поток генов, о чем свидетельствует медианная сеть, раскрашенная в зависимости от локализации гаплотипов (Рисунок 13). Наличие одинаковых гаплотипов в различных точках бассейна указывает на высокий уровень миграций. Действительно, миграционные пути подвидов европейского анчоуса достаточно сильно перекрываются [Зуев, 2014; Калнин, Калнина, 1985; Chashchin, 1996]. Таким образом, нет подтверждения какой-либо географической изоляции на основе изменчивости митохондриального гена цитохрома *b*.

Мы предположили, что возможно существует небольшая изоляция между подвидами, даже в случае больших зон симпатрии и образования смешанных

скоплений. Такая ситуация известна для популяций европейского анчоуса из северных районов Средиземноморского бассейна [Vembo et al., 1996; Vembo et al., 1996]. Для европейского анчоуса из Азово-Черноморского региона такая картина не подтвердилась. Медианная сеть, построенная на основе данных изменчивости *cytb* и раскрашенная в зависимости от подвиговой принадлежности каждого гаплотипа, также демонстрирует одинаковую частоту встречаемости неуникальных гаплотипов у *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus* (Рисунок 13).

В результате микросателлитного анализа было показано отсутствие генетически отличающихся совокупностей анчоуса в Азово-Черноморском бассейне. Предположение о том, что подвиды анчоуса могут различаться на основе изменчивости микросателлитных локусов также не подтвердилось. Различающиеся по морфологии отолитов две группы хамсы (Рисунок 22) не имеют различий по генетическим характеристикам (Рисунок 18, 19, 21).

Мы не выявили различий не только между азовским и черноморским анчоусом, но и между различными географическими районами (Таблица 14, Рисунок 15, 17). Отсутствие генетической дифференциации по регионам подтверждается и низкими значениями генетических расстояний, и индексами фиксации, рассчитанными по 7 микросателлитным локусам.

Такая генетическая гомогенность на основе микросателлитных локусов и митохондриального гена при наличии достоверно отличающихся морфологических форм не предполагалась. Особенно после работ Калниных на основе исследования белкового полиморфизма, в результате которых были выделены 4 популяции в Черном и Азовском морях: азовский и черноморский подвиды, их гибриды, и возможные гибриды черноморского и средиземноморского анчоуса [Калнин, Калнина, 1985]. О возможном существовании четырех или пяти популяций на основе индекса отолитов говорилось в работе Зуева [Зуев, 2014], хотя упоминались другие районы. Таким образом, работы на основе морфологических и аллозимных данных, биохимических и овоцитопаразитологических методов показывают сложную видовую структуру и дифференциацию между подвидами. Мы же наблюдаем абсолютное несовпадение дифференциации двух подвидов

европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне по морфологическим и генетическим характеристикам. При этом отсутствие дифференциации показано не только с помощью традиционного митохондриального маркера *cytb*, который используется в филогенетических исследованиях, но и с помощью более переменных микросателлитных локусов, применяющихся в популяционной генетике. Несовпадение данных по аллозимным и микросателлитным маркерам, возможно обусловлено постоянным потоком генов по всему Азово-Черноморскому бассейну (за счет активных миграций), что привело к потере дифференциации, которую наблюдали Калнины [1985].

Наличие морфологической дифференциации при отсутствии генетической заставляет задуматься о корректности таксономического статуса азовского и черноморского подвидов европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне.

Как говорилось в первой главе, проблема критериев для выделения подвидов всегда оставалась сложной, а с появлением молекулярно-генетических методов перешла на новый уровень. В последнее время с увеличением количества данных по изменчивости различных генетических маркеров (митохондриальные и ядерные гены, микросателлитные локусы и т.д.) происходит пересмотр таксономического статуса различных видов и подвидов. Майр указывает, что часто происходят ошибки при определении подвида, которые связаны с географической изменчивостью [Майр, 1971]. Критика подвида, как таксономической единицы, высказывалась давно и связана с низкой эффективностью использования данной категории [Wilson, Brown, 1953]. В настоящее время для подтверждения валидности статуса подвида морфологических параметров недостаточно [Алтухов, 1997]. Необходимо подтвердить дифференциацию подвидов на основе генетических критериев [Ворошилова, 2016; Винарский, 2015, Пантелеев, 1992; Пантелеев, 2000; Avise, 2000; Barrowclough, 1982; Thorpe et al., 1991].

Как было рассмотрено выше, в данной работе использовались 2 различных генетических маркера (митохондриальный ген *cytb* и 8 микросателлитных локусов), которые не выявили генетических отличий между подвидами. Несмотря на различные места нереста азовского и черноморского анчоуса, накопление

гаплотипических вариантов, свойственных каждому подвиду, не наблюдается. Такая генетическая гомогенность между рассматриваемыми выборками может объясняться высоким уровнем миграций европейского анчоуса по всему Азово-Черноморскому бассейну и отсутствием пространственно обособленных репродуктивных, нагульных и зимовальных областей. Данные по миграционным путям [Chashchin, 1996] подтверждают существование больших районов Черного моря, где данные подвиды пересекаются и образуют смешанные скопления. Также не единожды упоминалось о возможном заходе черноморской хамсы в Азовское море [Данилевский, 1960]. Кроме того, Калнины также говорили о существовании гибридов в Азово-Черноморском регионе и о смешении популяций анчоуса на основе аллозимных маркеров [Калнин, Калнина, 1985]. Таким образом, в данном случае мы наблюдаем эффект стрейнга, который приводит к образованию смешанных не только зимовальных, но и нерестовых скоплений, что в свою очередь ведет к большому потоку генов между подвидами и, как следствие, их генетической гомогенности.

Тем не менее, две группы азово-черноморских анчоусов достоверно различаются по морфологическим параметрам отолитов. Эта фенотипическая дифференциация может быть вызвана тем, что морфологические критерии (длина тела, размеры и форма отолитов, окраска чешуи, жирность, различная степень зараженности паразитами) могут варьировать и являться отражением условий обитания в различных географических районах. Следует отметить, что для популяций, населяющих области с различными климатическими условиями, морфологические отличия могут представлять собой норму реакции на внешнюю среду и выделять их в подвиды не имеет смысла [Майр, 1971].

В данном случае, основным морфологическим критерием, по которому идентифицируются азовский и черноморский анчоус, являются отолиты. Эти регистрирующие структуры могут являться отражением факторов среды: их форма может варьировать в связи с экологическими различиями условий роста [Campana, Casselman, 1993; Campana, Neilson, 1985; Cardinale et al., 2004; Vignon, 2012].

Как упоминалось ранее, особи анчоуса, которые по морфологическим характеристикам относятся к азовскому подвиду, населяют Азовское море и северо-западную часть Черного моря (так называемая «прибрежная форма»). Оба этих региона характеризуются более низкими значениями солености (10 – 14 ‰) [Ильин и др., 2009] по сравнению с остальной акваторией Черного моря, где нерестится черноморский подвид. Ранее уже были выделены две популяции хамсы, которые размножаются в воде с разной соленостью: прибрежная хамса – 10-15 г/л, солоноводная – 17-20 г/л [Данилевский, 1979].

Также различаются и условия по кормовой базе в этих регионах на момент нагула, что приводит к различиям в жирности данных подвидов [Демченко, 2012; Гаркопа, 1998]. Известно, что азовская хамса нагуливает больший процент жира чем черноморская [Shulman, 2002]. Различаются данные подвиды и по скорости роста, и некоторым меристическим признакам, о чем говорилось выше (глава 1). Многие исследования показали, что меристические признаки определяются местом, где растет молодь до определенного критического возраста и фенотипы определяются окружающей средой [Kinsey et al., 1994; Leary, Allendorf, Knudsen, 1985; Ryman et al., 1984; Taning, 1952;]. Это позволяет с их помощью отследить влияние внешних экологических факторов [Junquera, Perez-Gandaras, 1993].

Подобная морфологическая изменчивость наблюдается у генетически гомогенных популяций анчоуса в Средиземноморском бассейне [Jemaa et al., 2015; Shevchenko, 1981; Tudela, 1999]. Следует отметить, что для вида *Sardina pilchardus* наблюдается такая же дифференциация популяций из южных и северных районов Средиземноморья, как и для *E. encrasicolus* [Jemaa et al., 2015]. Это косвенно подтверждает влияние внешних факторов на форму отолитов. В тоже время, параметры отолитов можно использовать для изучения более-менее изолированных популяций со слабой генетической дифференциацией, что делает невозможным использование молекулярно-генетических маркеров [Begg, Brown, 2000; Neves et al., 2011; Stransky et al., 2008].

Проведенный нами корреляционный анализ показал достоверную слабую корреляцию между формой отолита и факторами среды (Рисунок 24). Низкие

значения  $R$  мы объясняем тем, что анализировалась только хамса с размерами выше 60 мм, а это означает, что выборки не включали в себя сеголетов. За счет эффекта стрейнга даже нерестовые скопления являются смешанными, что, несомненно, занижает степень выявленной корреляционной зависимости.

Таким образом, различие внешних экологических факторов в районах, характерных для азовской и черноморской хамсы, наиболее вероятно приводит к появлению морфологических отличий, которые мы наблюдаем, на первом году жизни. В данном контексте, фенотипическая изменчивость у двух подвидов является ничем иным, как нормой реакции на различные экологические условия, в которых происходит нерест и нагул. Такая ситуация характерна для категории экологическая морфа или морфотип [Майр, 1971; Ворошилова, 2016].

Согласно с вышесказанным и полученными нами данными по отсутствию генетической дифференциации следует признать, что выделение подвидов у европейского анчоуса неоправданно. Азовского и черноморского анчоуса следует рассматривать как экологические морфы.

#### **4.2 Филогеография европейского анчоуса**

В предыдущей главе мы обсуждали морфологические отличия, характерные для двух экологических морф (азовской и черноморской). Некоторые авторы связывали такую дифференциацию с различным временем проникновения хамсы в Азовское и Черное моря и последующей изоляцией между бассейнами [Пузанов, 1936; Шевченко, 1980; Dobrovolov, 1992]. Однако, отсутствие филогеографических методов, позволяющих провести реконструкцию исторических событий расселения видов, не давало возможности определить время проникновения анчоуса в данный регион.

С появлением первых данных по рестрикционному анализу мтДНК [Magoulas, Tsimenides, Zouros, 1996] появилась возможность провести анализ распространения хамсы по ареалу. В первой главе мы упоминали несколько гипотез о времени расселения европейского анчоуса в данный регион. Каждая из

них имеет достаточно недостатков, и в этом вопросе нет единого мнения. Полученные нами данные по изменчивости митохондриального гена *cytb* позволяют дать оценку времени проникновения хамсы в Азовское и Черное моря.

Все гипотезы можно разделить на две группы: анчоус проник раньше, чем произошло последнее открытие Босфора (примерно 10 тысяч лет назад), или после этого.

Гипотеза Magoulas о проникновении анчоуса в Азово-Черноморский бассейн 100 – 130 тысяч лет назад маловероятна. Если предположить, что анчоус вселился в Черное море в это время, то в результате существовавшего водообмена по Манычу между Черным и Каспийским морями, анчоус должен был проникнуть в Каспийский бассейн, как и вся фауна эвксинского периода, однако в этом бассейне он не обитает [Иванов, Комарова, 2008]. Таким образом, он заселил Черное море позже.

Согласно палеогеографическим исследованиям, в позднем плейстоцене было два периода, в которые происходил приток вод из Средиземного моря (карангатский и тобечинский), после которых Черное море в новоэвксинский период стало полностью пресноводным [Yanina, 2014]. Полное опреснение стало причиной вымирания морских видов, в том числе и европейского анчоуса. Можно было бы предположить, что анчоус мог пережить соленостный кризис. Однако, на несостоятельность данной теории указывают полученные нами данные по изменчивости *cytb*. Сильные изменения гидрологических условий должны были отразиться на состоянии популяций в виде сокращения численности. Но отсутствие перепадов эффективной численности популяций на основе коалесцентного BSP анализа (Рисунок 14) свидетельствует о том, что для популяции анчоуса в Азово-Черноморском регионе не наблюдался экспансивный рост или резкое снижение эффективного размера популяции. Кроме этого, на филогенетическом дереве особи из Азовского и Черного морей не образуют отдельную кладу (Рисунок 22), много гаплотипов являются идентичными. С учетом скорости мутирования данного маркера – примерно 2% на млн лет [Grant, 2005], времени полной изоляции с карангатского периода (а в этот период пролив Босфор несколько раз закрывался,

что делало невозможным обмен генами) должно было хватить на накопление мутаций и формирование отдельной азово-черноморской группы, а этого не наблюдается.

Наши данные как по микросателлитным локусам, так и по митохондриальному гену отклоняют гипотезу Доброволова о том, что азовский анчоус – это анчоус, который заселил Азово-Черноморский бассейн 27 тысяч лет назад, а затем произошло повторное заселение региона (нынешним черноморским анчоусом [Dobrovola, 1992]). Низкое значение индекса фиксации и крайне низкие значения генетических дистанций (Таблица 11, 14) говорят об однородности анчоуса и отсутствии дивергенции между различными популяциями европейского анчоуса в Азово-Черноморском регионе. Наши результаты позволяют сделать вывод, что анчоус проник в Азово-Черноморский регион во время последнего открытия Босфора, что произошло 10 тысяч лет назад.

В тоже время, значение  $t$  указывает на начало роста популяции 128 тысяч лет назад (что соответствует карангатскому периоду). Это может означать активное расселение анчоуса в средиземноморском бассейне и его возможное первичное проникновение в Черное море, после чего он вымер в данном регионе из-за опреснения (причины, по которым мы отвергаем возможность того, что он пережил данный соленостный кризис, рассмотрены выше). Так как европейский анчоус является многочисленным активно мигрирующим видом, то если во время экспансивного роста его популяций в Средиземноморском бассейне, часть их проникла в Черное море, это никак не должно отразиться на состоянии средиземноморских популяций.

В соответствии с вышесказанным, нами предлагается следующий сценарий расселения европейского анчоуса в Азово-Черноморский бассейн. Во времена существования связи между Средиземноморским и Черноморским бассейнами регулярно происходило проникновение данного вида в этот регион. Около 120 – 130 тысяч лет назад началась экспансия анчоуса, что подтверждается нашими исследованиями, а также другими данными [Magoulas et al., 2006]. Однако, в результате полного опреснения Черного моря в новоэвксинский период все особи

анчоуса вымерли, не сумев приспособиться к такому гидрологическому режиму. Окончательно заселил он Черное море только в голоцене около 10 тысяч лет назад, когда восстановилась связь со Средиземным морем в результате открытия пролива Босфор.

Проникнув в Черноморский бассейн, хамса здесь широко распространилась и на сегодняшний день является одним из основных промысловых видов рыб в Азовском и Черном морях. Поэтому необходим контроль численности данного вида и анализ различных факторов, влияющих на состояние популяций.

*Анализ численности и состояния популяций европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне*

На основе данных об изменчивости митохондриального гена *cytb* можно судить о состоянии каждой популяции. Группы с побережья Турции и из Керченского пролива имеют наибольшие значения данного генетического параметра. Эти данные не противоречат тому, что в этой части региона более высокая скорость роста популяций по сравнению с западной. Большая численность популяций хамсы создает условия для успешного рыболовного промысла. Согласно сводкам по вылову анчоуса за последнее десятилетие, основной промысел происходит именно в восточной части Черного моря [Ozturk, Keskin, Engin, 2011; Popescu, 2010].

Предположение, что рост численности европейского анчоуса в восточной части Черного моря и Азовском море происходит более высокими темпами, чем в северо-западном районе Черного моря, подтверждают достоверные отрицательные значения Tajima's D для проб из Керченского пролива и Трабзона. Разница в скорости восстановления восточного и западного стада могла бы быть объяснена различными экологическими условиями в местах нагула и нереста (кормовой базой, соленостью, температурой), однако сильных отличий в данных районах не наблюдается. В тоже время можно предположить, что восстановление численности хамсы в восточной части Черного моря и Азовском море происходит не только за счет естественной флуктуации численности, но и за счет миграций из западных районов. Тесты на нейтральность могут отклоняться от нулевой гипотезы при

постоянном потоке генов между локалитетами ( $N_m$  более 5 % особей на поколение) [Ray, Currat, 2003].

В настоящее время популяции анчоуса в Азово-Черноморском регионе находятся в состоянии экспансивного роста (например, восстановление популяции после прохождения бутылочного горлышка или развитие популяции при небольшом числе основателей), о чем свидетельствует низкое значение нуклеотидного и высокое значение гаплотипического разнообразия. Наблюдаемая картина часто встречается у морских массовых пелагических рыб, к которым относится европейский анчоус. Такое соотношение данных параметров характерно для всего вида в целом [Castilho, Silva, 2016]. Низкое значение нуклеотидного разнообразия и большое число уникальных гаплотипов при наличии только двух широко распространенных (Рисунок 13) может свидетельствовать об экспансивном росте после недавнего прохождения популяцией бутылочного горлышка. Для подтверждения данного предположения был сделан анализ колебания численности анчоуса по литературным данным.

Следует отметить, что для популяции европейского анчоуса были характерны резкие спады численности в прошлом веке. С целью регулирования рыболовного промысла в Азово-черноморском бассейне в 1940-1950 года начались ихтиологические исследования по оценке биомассы хамсы. В 1949 году общий запас хамсы был оценен в 3 млн. т. [Дехник, 1954], затем он упал в 1950-х годах до 0,8 млн. т., иногда достигая значений в 1,5 млн. т. [Чашин, 1997; Ivanov, Beverton, 1985]. Начиная с 1960-х годов резко увеличивается вылов анчоуса [Зуев и др., 2011], что, одновременно с зарегулированием стока рек и, как следствием, повышением солености и ухудшением кормовой базы, приводит в 1970-х годах к сокращению общей численности по всему Азово-черноморскому бассейну в 4 раза. В период с 1980 по 1987 года восстановления численности популяций анчоуса не происходит, что связывают не только со сверхинтенсивным промыслом, но и массовым развитием атлантического вселенца гребневика *Mnemiopsis leidyi*, который выедал не только планктон, но икру и мальков хамсы [Зуев и др., 2010]. В эти годы общая численность азовского и черноморского анчоуса после вылова

достигала критических значений в 70 тысяч тонн (февраль, 1985) и за время нереста восстанавливалась в среднем до 250-450 тысяч тонн. Промысловый сезон 1990-1991 годов был самым кризисным: численность хамсы была настолько мала, что она не образовывала плотных скоплений, и это не позволило даже оценить ее биомассу в этот период [Chashchin, 1996]. После 1992 года анчоус начал постепенно восстанавливаться и до 2003 года его запасы колебались от 350 до 750 тысяч тонн [Shlyakhov, Charova, 2006]. В настоящее время, согласно ихтиологическим исследованиям, численность европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне постепенно увеличивается [Дроздов, 2011], средняя биомасса оценивается в 800 тысяч тонн.

Таким образом, мы наблюдали резкий спад численности в 1980-х – 1990-х годах, но в данном случае маловероятно что анчоус проходил через бутылочное горлышко, так как численность особей все равно оставалась очень большой и исчислялась миллионами особей. Также исследования 1980-1981 годов по белковому полиморфизму (лактатдегидрогеназа, эстераза, аспаратаминотрансфераза, изоцитратдегидрогеназа) показали смещение частот аллелей от уравнения Харди-Вайнберга и недостаток гетерозигот, что характерно для «эффекта Валлунда» при смешении особей из разных популяций [Калнин, Калнина, Дашкова, 1984].

В настоящее время популяция, как говорилось выше, находится в состоянии экспансивного роста, так как для данного процесса характерен высокий уровень гаплотипического разнообразия [Tajima, 1989b].

Выше говорилось о существовании двух гаплотипов, которые встречаются во всех пробах и имеют одинаковую частоту у обоих подвигов. Исходя из истории расселения анчоуса в Азово-Черноморский регион (данный вопрос обсуждался в предыдущем подразделе), наиболее вероятно, что европейский анчоус из Азово-Черноморского региона имеет одного основателя. Происхождение двух гаплотипов имеет два объяснения. Либо один гаплотип произошел от второго (вследствие фиксации мутаций) уже после расселения анчоуса в Азово-Черноморском бассейне, либо при прохождении горлышка бутылки

преимущественно осталось два гаплотипа, которые дали эффект экспансивного расселения. В пользу первого предположения говорят незначительные отличия между гаплотипами (разница в 3 точечных мутации). В то же время, ихтиологические данные показывают резкое уменьшение численности в 1950-х годах, что согласуется со вторым объяснением. Следует отметить, что оба предположения не являются взаимоисключающими. Превалирование двух основных гаплотипов можно также объяснить и положительным отбором, но такой гипотезе противоречат значения тестов на нейтральность.

В настоящий момент популяции анчоуса в Азовском и Черноморском морях находятся в состоянии экспансивного роста, что подтверждается не только ихтиологическими исследованиями, но и данными по изменчивости мтДНК.

Подходы, применяемые в филогеографии, позволяют не только выявить закономерности расселения и дать демографическую оценку состоянию популяции. Филогенетические методы предоставляют возможность найти причины появления дивергенции как между видами, так и между популяциями. Так, географическая изоляция часто приводит к уменьшению потока генов между популяциями и формированию обособленных клад, которые отражают географическое распределение генеалогических линий. Однако, в случае европейского анчоуса генетической дивергенции мы не наблюдаем.

#### *Генетическая изменчивость европейского анчоуса на всем ареале*

Все, проведенные ранее работы, демонстрируют слабую генетическую гетерогенность европейского анчоуса по митохондриальным маркерам [Borrell et al., 2012; Castilho, Silva, 2016; Ouazzani et al., 2015; Oueslati et al., 2014; Pappalardo et al., 2015; Silva et al., 2014; Vinas et al., 2014]. Построенное нами филогенетическое дерево выявляет только две клады с высокой бутстреп поддержкой (Рисунок 25). Внутри этих двух митохондриальных линий (о которых рассказывалось в 1 главе) с уровнем дивергенции в 1,5% отмечается сильная гомогенность. Наши данные показали отсутствие дифференциации не только между Азовским и Черным морями, но и между этим регионом и Средиземноморским и Атлантическим бассейнами.

Такое отсутствие генетической дифференциации между анчоусами из разных бассейнов отмечалось не единожды [Oueslati et al., 2014; Borrell et al., 2012; Sanz et al., 2008]. Это достаточно неожиданно в силу наличия изоляции между Атлантическим и Средиземноморским регионами, а также широкого ареала анчоуса (от севера до юга Атлантики).

Одна из причин отсутствия дифференциации может лежать в небольшом времени изоляции. Но по литературным данным время экспансивного роста для двух клад колеблется от 40 тысяч до 250 тысяч лет назад [Borrell et al., 2012; Grant, 2005; Magoulas et al., 2006; Silva et al., 2014;]. По-видимому, именно в этот период произошло распространение каждой клады по всему ареалу анчоуса. Согласно скорости мутирования по митохондриальным генам, прошедшего времени с момента расселения в различные бассейны достаточно для накопления замен и, тем не менее, дифференциация по *cytb* внутри клады А (как и внутри клады В) не возникла и на всем ареале наблюдается генетическая однородность по данному маркеру внутри двух филогенетических линий.

Гомогенность может быть объяснена постоянным потоком генов между формами анчоуса. Подобная ситуация характерна для видов с большим эффективным размером популяций и высоким уровнем миграций [Waples, 1998]. Способность анчоуса перемещаться на большие расстояния, упоминается и в работе Силва с соавторами, где говорится о расширении ареала европейского анчоуса на северо-запад Атлантического океана в результате миграций [Silva, Horne, Castilho, 2014]. Несмотря на то, что у морских животных потенциальным барьером для потока генов может являться экваториально-тропическая граница, разделяющая северное и южное полушария [Briggs, 1995], для анчоуса, по-видимому, это не так. Большая толерантность к температуре позволяет совершать миграции с севера на юг Атлантики и в обратном направлении. Кроме того, неоднократно упоминалось о способности анчоуса преодолевать проливы, которые соединяют бассейны [Demir, 1974; Danilevsky, 1961].

Результаты проведенного нами моделирования экологических ниш для двух митохондриальных линий на временных отрезках в 6 и 21 тысячу лет назад не

противоречат гипотезе о перемешивании двух линий в результате миграций. Согласно палеоклиматическим данным 21 тысячу лет назад анчоус, с гаплотипами клады В не имел широкого распространения в Средиземноморском бассейне, а был в основном сосредоточен в северной части Атлантики, в то время как для митохондриальной линии А благоприятные условия были как и в Средиземноморье, так и в Атлантике (Рисунок 34). Пересекающиеся ареалы подтверждают высказанное предположение о вторичном контакте этих двух клад. Моделирование экологических ниш в Maxent показало, что 6 тысяч лет назад происходит расширение ареала вида на север Атлантического океана, что связано с потеплением после последнего ледникового периода (Рисунок 33). Вероятно, в этот период происходит активная миграция, которая приводит к полной однородности двух линий на всем ареале. Смоделированные экологические ниши для двух клад практически соответствует их современному распространению. К сожалению, данные по гидрологическим режимам бассейнов существуют только начиная с периода в 21 тысячи лет назад, и мы не можем провести моделирование для периода времени, когда предположительно произошла дивергенция двух митохондриальных линий и период начала их экспансивного роста.

Гипотеза о влиянии миграций на слабую генетическую гетерогенность европейского анчоуса по митохондриальным генам подкрепляется нашими данными, показывающими отсутствие дифференциации по митохондриальной ДНК между Азово-Черноморскими популяциями и анчоусом из остальной части ареала.

#### **4.3. Влияние климатических факторов на распределение митохондриальных линий в Азово-Черноморском регионе**

Анализ литературных данных распределения двух филогрупп вместе с полученными нами данными по изменчивости мтДНК (на основе *cytb*) подтвердил наличие клинального характера соотношения частот гаплотипов, характерных для каждой клады А и В, на всем ареале европейского анчоуса (Рисунок 26). Такая

картина обсуждалась во многих работах ранее. Такое распределение не может быть случайным и вероятнее всего, на формирование наблюдаемой мозаики оказывают влияние какие-то факторы. Основная гипотеза, объясняющая такое распределение, заключалась во влиянии двух основных гидрологических факторов (температуры и концентрации кислорода) на частоту встречаемости этих гаплогрупп и наличие отрицательного отбора [Silva et al., 2014]. Однако, данный вывод основывался на анализе особей без учета данных по Азово-Черноморскому бассейну. Наши данные по Азово-Черноморскому региону дополнили анализ и позволили сформировать гипотезу расселения анчоуса и выявить гидрологические факторы, приводящие к такому распределению.

На рисунке по распределению частот гаплотипов клад А и В (Рисунок 26) выделяются определенные зависимости соотношения частот двух клад от географического региона. Принято выделять 4 характерных группы анчоуса согласно бассейнам, в которых они обитают: Атлантический, Средиземноморский, Черноморский и Азовский. Рассмотрим распределение митохондриальных линий в них более подробно.

В Атлантическом океане частота каждой клады носит явно клинальный характер: в пробах анчоуса, собранных ближе к экватору, преобладает клад А, с удалением от экватора к северу и югу начинает преобладать клад В. Следует отметить, что в Бискайском заливе представлены обе клады с почти одинаковым соотношением. Такая ситуация не вызывает вопросов и объясняется нерестовыми миграциями: Бискайский залив является традиционным местом для нереста и нагула европейского анчоуса [Allain et al., 2001]. Таким образом, пробы представляют собой смешанные скопления анчоуса, мигрирующего в залив с северных и южных регионов.

В Средиземном море представлены обе клады, все пробы являются смешанными, с небольшим преобладанием той или иной филогруппы. Закономерность такая же, как и в Атлантическом океане: в пробах из северной части преобладают особи из клад В, на юге – из клад А. Совпадение в направленности распределения от северных районов к южным, заставляет в

первую очередь думать, что именно температурный фактор формирует такую мозаику. Согласно этому предположению в Азово-Черноморском бассейне мы предполагали увидеть также смешанные гаплотипы по всему региону с преобладанием В на севере и А около берегов Турции. Однако это предположение не подтвердилось.

В Черном и Азовском морях почти полностью отсутствуют гаплотипы, характерные для клады В. Особи, относящиеся к этой митохондриальной линии обнаружены были ранее только в одной точке около берегов Болгарии (по данным изменчивости COI). Все остальные пробы полностью представлены только кладой А.

Другими исследователями на основе рестрикционного анализа мтДНК особей из нескольких точек Азово-Черноморского бассейна, также отмечалось преобладание гаплотипов, характерных для клады А. Выдвигалось две гипотезы, почему клада В практически не представлена в Черном море: отрицательный отбор или отсутствие потока генов [Magoulas et al., 1996]. Наиболее вероятным кажется предположение о низком уровне миграции анчоуса вследствие сложности прохода через систему проливов Босфор и Дарданеллы. Авторами отмечалось, что анчоус не входит в список рыб, которые во взрослом состоянии мигрируют через Босфор в Мраморное море [Ivanov, Beverton, 1985] и из Мраморного моря в Черное [Kocatas et al., 1993]. Так как верхнее течение в Босфоре идет из Черного моря в Мраморное, то невозможна и миграция икры в обратном направлении [Ekman, 1953; Niermann et al., 1994]. Таким образом, был сделан вывод, что причиной отсутствия клады В является недостаток потока генов из Средиземноморского в Азово-Черноморский бассейн в следствие его изоляции [Magoulas et al., 1996]. Однако данная гипотеза не дает ответа на ряд вопросов, о которых говорится ниже.

Во-первых, предположительно клада В уже присутствовала в Средиземноморском бассейне, когда произошло последнее открытие Босфора. Если это предположение верно, то при открытии Босфорского пролива 10 тысяч лет назад, анчоус, представляющий данную филогруппу, однозначно должен был

попасть в Черное море и распространится по всему региону. Соотношение гаплогрупп должно быть в этом случае одинаковым, а этого мы не наблюдаем.

Во-вторых, существует несколько работ, показывающих возможность потока генов между двумя бассейнами. Впервые о миграциях из Черного моря в Мраморное упоминалось в 1963 году, но не было достаточно доказательств [Demir, 1965]. Позже стало известно, что черноморский анчоус при неблагоприятных условиях мигрирует в Мраморное море осенью на зимовку и обратно весной на нерест и нагул [Demir, 1974; Danilevsky, 1961]. Позже другие авторы показали на основе формы икры, что анчоус из Мраморного моря в результате эффекта стрейнга заходит вместе с черноморским в Черное море и его икра распространяется вдоль берегов Турции [Gordina, 1997]. В 1985 году на основе данных белкового полиморфизма показано существование возможных гибридов черноморского и средиземноморского анчоуса [Калнин, Калнина, 1985]. Тогда если, недостаток гаплотипов, характерных для клады В, обусловлен согласно Magoulas низким потоком генов, с учетом вышесказанного особи, относящиеся к кладе В и хорошо представленные в Мраморном море, должны были пусть и в небольшом количестве проникать в Черное море и постепенно распространяться вдоль болгарского и турецкого побережья. Однако, наши данные показали полное отсутствие таких особей как около Турции, так и около Босфорского пролива. Смешанная точка была обнаружена по литературным данным близ берегов Болгарии и их количество составило 38% от общего числа особей. В тоже время из 84 особей, собранных нами по всему Азово-Черноморскому бассейну, ни одна не относится в кладе В. С учетом схемы миграций хамсы в Черном море [Chashchin, 1996] клада В должна быть представлена в большинстве точек данного региона, благодаря высокому потоку генов, характерному для массовых мелких активно-мигрирующих пелагических рыб. Это не наблюдается.

Согласно с вышесказанным, мы предполагаем, что отсутствие клады В в Черном и Азовском морях больше согласуется с первой гипотезой, высказанной ранее, и связано с отрицательным отбором под действием какого-либо фактора.

Как говорилось в первой главе, несмотря на то что митохондриальная ДНК считается нейтральным генетическим маркером, в последнее время все больше появляется работ, где показана роль митохондриальных генов в процессе адаптации к определенным условиям [Blier, Dufresne, Burton, 2001; Quintela et al., 2014; Willett, Burton, 2004]. Однако, говорить о возможной экологической адаптации можно, если существуют несинонимические мутации в анализируемом белок-кодирующем фрагменте. У европейского анчоуса была выявлена точечная информативная мутация для *cytb*, приводящая к замене 368 аминокислоты и изменению структуры белка. Данная мутация характерна для клады В и заключается в замене аланина на метионин [Silva et al., 2014]. В исследовании по COI также были выявлены белковые замены у двух клад (тесты подтвердили отбор): в 11 кодоне гистидин (у клады А) заменяется на метионин (у клады В), в 121 кодоне пролин (А) заменяется на гистидин (В) [Pappalardo et al., 2015]. Во всех работах подтвердилось отсутствие нейтральности для этих мутаций. Такое количество информативных аминокислотных замен и наличие направленного отбора, свидетельствует о существовании факторов, влияющих на наблюдаемое распределение частот встречаемости клад А и В, о котором говорилось выше.

Было показано, что температура играет определяющую роль в формировании мозаичной структуры распределения гаплотипов [Silva et al., 2014]. Однако, это противоречит полученным нами данным. Черное море является холодным и имеет очень сильный градиент температуры. Резкое падение температуры до значений, сопоставимых с северными морями, наблюдается уже на 25 м (Рисунок 27). Анчоус обитает на глубине до 100 м [Световидов, 1985] и, соответственно с гипотезой о влиянии температуры на распределение гаплотипов, в Азово-Черноморском бассейне должны преобладать особи, относящиеся к холодолюбивой кладе В (что не наблюдается). Следует отметить, что теплолюбивые особи клады А обнаружены во всех пробах из холодноводных районов. Поэтому температура не может являться фактором, который привел к отрицательному отбору и исчезновению клады В в данном регионе.

Следует отметить, что наши результаты показали, что температура остается фактором, влияющим на распределение гаплогрупп (Таблица 16, 17). По всей видимости, она оказывает влияние в случае, когда анчоус имеет возможность свободно мигрировать из регионов с неблагоприятными условиями. Это объясняет большую долю гаплотипов клады В в холодных водах на севере и юге Атлантического бассейна. Такое же влияние температуры наблюдается и в Средиземноморском бассейне: преобладание холоднолюбивого анчоуса на севере региона. Свободное перемещение анчоуса по Атлантическому и Средиземноморскому бассейнам приводит к формированию наблюдаемой мозаичной структуры распределения клад. В тоже время частичная изоляция между этими двумя регионами (наличие пролива Гибралтар), ограничивает выход холоднолюбивого анчоуса (клада В) из теплых вод Средиземноморского бассейна, что приводит к образованию смешанных скоплений по всему морю, с преобладанием соответствующих митохондриальных линий на севере и юге Средиземноморья.

Теплолюбивый анчоус клады А, обитающий в Азовском и Черном море, в силу изолированности данного бассейна, не может свободно мигрировать в более теплые воды Средиземноморья. Но как говорилось выше, известно, что часть его все-таки уходит на зимовку в Мраморное море. Такая миграция анчоуса (более 95% особей которого принадлежат к кладе А), населяющего Азово-Черноморский регион, как раз объясняется именно тем, что филогруппа А, действительно является теплолюбивой.

Другим гидрологическим фактором, отличающим Азово-Черноморский бассейн, является соленость. Проведенный ANOVA Крускала-Уоллиса показал достоверную зависимость распределения частот гаплотипов клад от солености (Таблица 16, Рисунок 29). Ранее эта зависимость не была установлена, так как отсутствовали выборки из Азовского и Черного морей. Таким образом, клада В, вероятно, характеризуется слабой выживаемостью при значениях солености, характерных для Азово-Черноморского региона. Так как данный вид является эвригалинным, маловероятно, что соленость Черного и Азовского морей может

приводить к гибели взрослых особей. Мы предполагаем, что отрицательный отбор происходит на уровне стадии икры, так как именно в этот момент, в силу пропускной способности оболочки, наблюдается наибольшее влияние внешних факторов на развитие икры. Для подтверждения данной гипотезы был проведен анализ для нерестовых выборок и для всех.

Влияние солености на распределение гаплотипов двух митохондриальных линий в нерестовых скоплениях анчоуса подтверждается непараметрическим ANOVA ( $p < 0,001$ ). Результаты моделирования MaxEnt и кривые отклика по солености (Рисунки 30, 31) также показали увеличение влияния данного гидрологического фактора при внесении в модель только нерестовых скоплений. Согласно полученным данным, предсказанные комфортные условия по солености для нерестовых скоплений гаплогруппы В должны быть выше 20 ‰. Это свидетельствует в пользу гипотезы, что отбор происходит во время нереста и приводит к гибели икринок клады В в условиях пониженной солености.

Влияние солености только на икру (нерестовые скопления) объясняет наличие клады В в точках из Балтийского моря с крайне низкой соленостью 7 – 8 ‰ (это зимовальные скопления анчоуса). Для взрослого анчоуса соленость не может быть фактором, который приводит к вымиранию, так как этот вид, как говорилось выше, обитает в водах с широким диапазоном солености (5 – 41 ‰).

На Рисунке 32 показаны результаты моделирования географического распространения двух гаплогрупп европейского анчоуса по всему ареалу. Рассмотрены оба случая: для всех скоплений и только для нерестовых. Полученные карты подтверждают нашу теорию о подходящих условиях как для взрослых свободно-мигрирующих особей, так и для нерестовых популяций.

Предложенная нами модель распространения двух филогрупп показана на Рисунке 35.

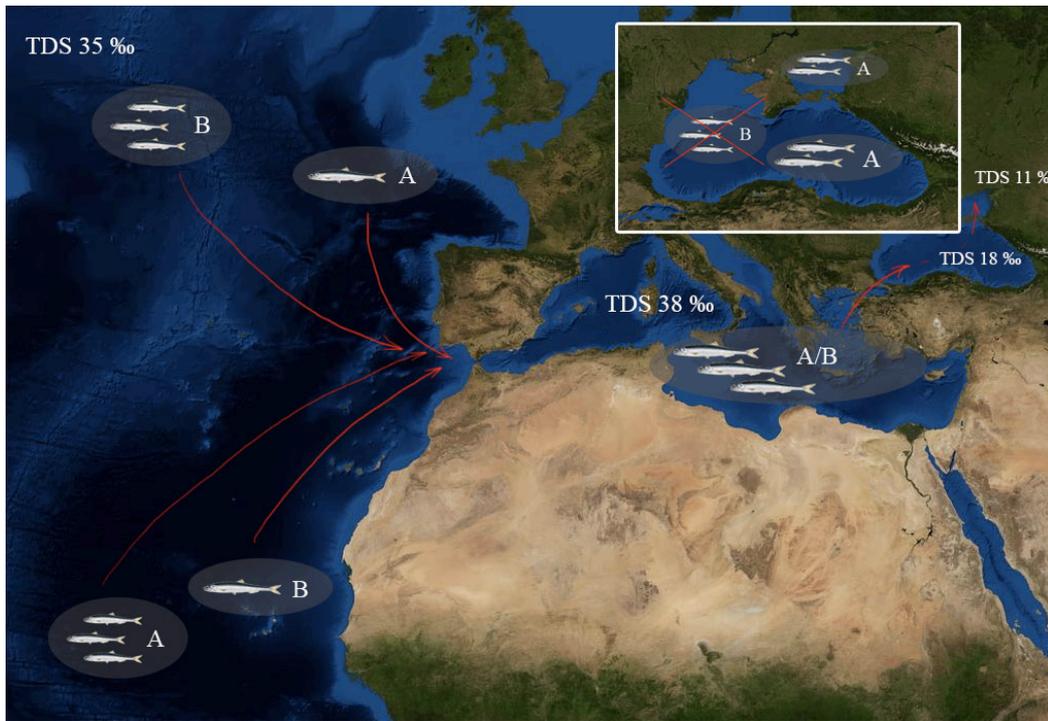


Рисунок 35 – Предполагаемая модель распространения двух митохондриальных линий под действием гидрологических факторов

Для клады А характерно распространение по всему ареалу, что связано с большей толерантностью к условиям среды. Согласно кривым отклика (Рисунок 30) данная гаплогруппа более теплолюбива, чем гаплогруппа В. Этим объясняется увеличение частоты гаплотипов данной группы ближе к экватору. Для клады В подходящие условия наблюдаются в северной части Атлантического океана и Средиземного моря. Для взрослых особей европейского анчоуса клады В условия в Черном море достаточно приемлемы, поэтому особи анчоуса из клады В, которые встречаются около берегов Болгарии, являются мигрантами из Мраморного моря. Если учитывать только нерестовые скопления, то гидрологические условия Черного и Азовского морей плохо подходят для клады В. В результате действия отрицательного отбора еще на стадии икры, клада В не распространяется по всему бассейну. Гибриды черноморского и средиземноморского анчоуса [Калнин, Калнина, 1985] вероятно принадлежат только к митохондриальной линии А.

Таким образом, предложенная нами гипотеза отрицательного отбора под действием низких значений солености на икру может объяснить отсутствие представителей клады В по всему Азово-Черноморскому бассейну.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Европейский анчоус обладает большим ареалом за счет высокой толерантности к гидрологическим режимам. Ожидаемая генетическая дифференциация между популяциями анчоуса, населяющими различные бассейны, не подтвердилась, несмотря на их полуизолированность. Такая ситуация вполне характерна для мелких пелагических активно мигрирующих рыб. В то же время выделяют различные популяции анчоуса, которые отличаются по некоторым морфологическим параметрам (окраска, размеры и т.д.) и условиями обитания. Некоторые такие популяции достоверно отличаются по различным ядерным маркерам, что, по мнению отдельных исследователей, служит основанием для выделения в Средиземном море самостоятельного вида – *E. albidus* [Borsa, Collet, Durand, 2004; Bouchenak-Khelladi et al., 2008; Karahan et al., 2014]. Противоположная ситуация наблюдается в Азово-Черноморском регионе, где остро стоит проблема обоснованности выделения двух подвидов анчоуса, так как он является массовым промысловым видом. Эти выделенные ранее два подвида, достоверно различающиеся по морфологическим характеристикам, генетически не дифференцированы (ни по митохондриальным, ни по ядерным маркерам). Это ставит под сомнение целесообразность придания им самостоятельного таксономического статуса. В то же время разные регионы нереста определяют морфологические различия, которые закладываются на раннем этапе развития в первый год жизни. Показана корреляция между морфами и различными условиями нереста и нагула (соленость, температура). Таким образом, по результатам как морфологического, так и генетического анализа, данные подвиды европейского анчоуса (*E. e. ponticus* и *E. e. maoticus*) следует рассматривать как экологические морфы (черноморская и азовская).

В Азово-Черноморском регионе внутривидовая структура представлена множеством субпопуляций, в пределах каждой экологической морфы. Так популяции из Азовского моря и северо-западной части Черного моря представляют собой азовскую морфу (что коррелирует с экологическими особенностями данных

регионов), а популяции из остальной части Черного моря, соответственно, черноморскую. В результате того, что их миграционные пути постоянно пересекаются и зимой образуются смешанные скопления, происходит постоянная гибридизация. Высокий поток генов обуславливает генетическую гомогенность анчоуса не только внутри Азово-Черноморского бассейна, но и на всем ареале. В настоящий момент, популяции европейского анчоуса из Азовского и Черного морей находятся в состоянии экспансивного роста.

Существующие две митохондриальные линии А и В имеют клинальное распределение на ареале, которое обусловлено различными гидрологическими факторами. На основе данных об изменчивости митохондриального гена *cytb* у европейского анчоуса из Азово-Черноморского бассейна (и сопоставления их с данными литературы) выдвинута гипотеза о действии отрицательного отбора на кладу В под действием низких значений солености. Гибель особей наиболее вероятно происходит на стадии икры. Подтверждена зависимость распространения взрослых особей анчоуса, принадлежащих к различнымкладам от температуры: анчоус, принадлежащий к кладе А, является более теплолюбивым чем анчоус, принадлежащий к кладе В. Это обуславливает преобладание клады В на севере и юге Атлантики и на севере Средиземноморского бассейна. Не исключается возможность влияния какого-либо другого дополнительного фактора на распределение двух митохондриальных линий европейского анчоуса.

На основе анализа распределения митохондриальных линий по ареалу и палеоклиматических данных, показано, что европейский анчоус проникал в Черное море в период своего экспансивного роста (по нашим данным это примерно 120 – 130 тысяч лет назад), однако последующее полное опреснение Черноморского бассейна привело к вымиранию данного вида в этом регионе. Окончательно европейский анчоус распространился в данном регионе после последнего открытия Босфорского пролива в новоэвксинский период. Азовское и Черное моря были заселены в одно время, что объясняет отсутствие генетической дифференциации внутри данного региона.

## ВЫВОДЫ

1. Традиционно выделяемые черноморско-азовские подвиды европейского анчоуса (*E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus*) не обнаруживают генетической дивергенции по митохондриальному гену *cytb* и ядерным маркерам (8 микросателлитных локусов). Морфологическая дифференциация по форме отолитов позволяет выделить у европейского анчоуса в Черноморско-Азовском регионе две морфы: азовскую и черноморскую. Различия в форме отолитов между этими морфами коррелируют с различиями в соленостном и температурном режимах в местах нереста.
2. Анализ микросателлитных локусов свидетельствует о том, что между морфами европейского анчоуса в Азово-Черноморском регионе происходит постоянная гибридизация.
3. Отсутствие генетической дифференциации азово-черноморского анчоуса, представленного одной из митохондриальных средиземноморских филогенетических линий, предполагает необоснованность присвоения подвидового статуса азово-черноморским морфам, дифференциация которых обусловлена гидрологическими различиями на нерестилищах.
4. Наблюдаемое распределение по ареалу двух митохондриальных гаплогрупп, выявленных у европейского анчоуса *E. encrasicolus* формируется под действием гидрологических факторов. Основное влияние оказывают температура и соленость. Отсутствие гаплогруппы В в Азово-Черноморском бассейне коррелирует с низкой соленостью Азовского и Черного морей.
5. Проникновение особей из гаплогруппы В в крайнюю западную часть Черного моря (Варна, Болгария) свидетельствует о миграции средиземноморских популяций анчоуса из Мраморного моря в Черное.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аверкиев, Ф.А. Сборник статистических сведений об уловах рыбы и нерыбных объектов в Азово-Черноморском бассейне за 1927-1959 гг. / Ф.А. Аверкиев // Труды АзНИИРХ. – 1960. – Т. 1, вып. 2. – 93 с.
2. Аладин, Н.В. Концепция относительности и множественности зон барьерных соленостей и формы существования гидросферы / Н.В. Аладин, И.С. Плотников // Труды Зоологического института РАН. – 2013. – №3. – С. 7–21.
3. Александров, А.И. Анчоусы Азовско-Черноморского бассейна, их происхождение и таксономическое обозначение / А.И. Александров // Труды Керченской научной рыбохозяйственной станции. – 1927. – Т. 1, № 2–3. – С. 3–99.
4. Алтухов, Ю.П. Иммуногенетический анализ внутривидовой дифференцировки европейского анчоуса обитающего в Черном и Азовском морях. Сообщение I / Ю.П. Алтухов // Генетика. – 1969. – 5, № 4. – С. 50–64.
5. Алтухов, Ю.П. Иммуногенетический анализ внутривидовой дифференцировки европейского анчоуса обитающего в Черном и Азовском морях. Сообщение II / Ю.П. Алтухов // Генетика. – 1969. – 5, № 5. – С. 81–94.
6. Алтухов, Ю.П. Популяционная генетика рыб / Ю.П. Алтухов – М.: Пищевая промышленность, 1974. – 83 с.
7. Алтухов, Ю.П. Вид и видообразование / Ю.П. Алтухов // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – 4. – С. 2 – 10.
8. Алтухов, Ю.П., Иммуногенетический анализ внутривидовой дифференцировки европейского анчоуса, обитающего в Черном и Азовском морях. Сообщение I. Группы крови анчоуса и возможный механизм генного контроля. Гетерогенность азовской расы / / Ю.П. Алтухов, В.В. Лиманский, А.Н. Паюсова, К.А. Трувеллер // Генетика. – 1969. – 5, № 4. – С. 50–64.
9. Баклашова, Т. А. Ихтиология / Т.А. Баклашова. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 322 с.
10. Бурдун, Г.Д. Основы метрологии: Учеб. пособие. / Г.Д. Бурдун, Б.Н. Марков– М.: Изд. стандартов, 1984. – 312 с.

11. Винарский, М.В. Судьба категории подвида в зоологической систематике. 2. Современность / М.В. Винарский // Журнал общей биологии. – 2015. – Т. 76, вып. 2. – С. 99–110.
12. Виноградов, К.А. К биологии северо-западной части Черного моря / К.А. Виноградов // Зоологический журнал. – 1956. – Т. 35, вып. 4. – С. 492–500.
13. Водясова, Е.А. Идентификация подвигов европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* (Engraulidae) в зимовальных скоплениях на основе морфологических параметров отолита / Е.А. Водясова, А.А. Солдатов // Вопросы ихтиологии. – 2017. – Т. 57, вып. 4. – С. 1–8.
14. Ворошилова, И.С. Проблемы и перспективы применения молекулярно-генетических методов для таксономической ревизии пресноводных моллюсков / И.С. Ворошилова // Труды ИБВВ РАН. – 2016. – Т. 73, № 76. – С. 12–24.
15. Гаргопа, Ю.М. Влияние климатических факторов на крупномасштабную изменчивость элементов водного баланса, солености и отдельных компонентов биоресурсов Азовского и Черного морей / Ю.М. Гаркопа // Сборник научных трудов АзНИИРХ (1996-1997 гг.). – Ростов-на-Дону, 1998. – С. 7–23.
16. Гетьман, Т.П. Система описания сагиттальных отолитов рыб / Т.П. Гетьман // Биологический вестник Харьковского национального университета им.В.Н. Каразина. – 2001. – Т. 5, №1-2. – С. 147–148.
17. Гетьман, Т.П. Строение отолитов азовского (*Engraulis encrasicolus maeoticus*) и черноморского (*Engraulis encrasicolus ponticus*) анчоусов / Т.П. Гетьман // Вестник зоологии. – 2004. – Т. 38, №4. – С. 79–81.
18. Гетьман, Т.П. Морфология отолитов некоторых видов рыб азово-черноморского бассейна / Т.П. Гетьман // Морской экологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 13–22.
19. Данилевский, Н.Н. Миграции черноморской хамсы и факторы, их обуславливающие / Н.Н. Данилевский // Труды АзчерНИРО. – 1958. – № 17. – С. 51–74.

20. Данилевский, Н.Н. О проникновении черноморской хамсы в Азовском море и сопутствующих условиях среды / Н.Н. Данилевский // Труды АзчерНИРО. – 1960. – № 18. – С. 118–129.
21. Данилевский, Н.Н. Важнейшие факторы, определяющие сроки и районы образования промысловых скоплений черноморской хамсы / Н.Н. Данилевский // Труды АзчерНИРО. – 1964. – № 22. – С. 115–124.
22. Данилевский, Н.Н. Анчоус *Engraulis encrasicolus ponticus* Alex. / Н.Н. Данилевский // Сырьевые ресурсы Черного моря. – М.: Пищ. про-сть, 1979. – С. 25–73.
23. Данилевский, Н.Н. К изучению распределения анчоусов Азово-Черноморского бассейна при помощи овоцитопаразитологического метода / Н.Н. Данилевский, Г.Г. Камбуров // Вопросы ихтиологии. – 1969. – Т. 9, №6. – С. 1118–1125.
24. Данилевский, Н.Н. Анчоус – *Engraulis encrasicolus ponticus* Alex. / Н.Н. Данилевский, А.А. Майорова // Сырьевые ресурсы Чёрного моря. 1979. – С.25–73.
25. Демченко, В.А. Трансформация ихтиофауны Азовского моря в условиях изменения климата и возможные социально-экономические последствия / В.А. Демченко // Биологические системы. – 2012. – Т. 4, №4. – С. 423–428.
26. Дехник, Т.В. Размножение хамсы и кефали в Черном море / Т.В. Дехник // Труды ВНИРО. – 1954. – №. 26. – С. 34–48.
27. Дирипаско, О. А. Рыбы Азовского моря / Дирипаско О.А., Изергин Л.В., Демьяненко К.В. – Бердянск: Издательство ООО «НКП Интер-М». – 2011. – 288 с.
28. Доброволов, И. Полиморфизм мышечных протеинов хамсы *Engraulis encrasicolus* Азово-Черноморского бассейна и Атлантического океана / И. Доброволов // Вопросы ихтиологии. – 1978. – Т. 18, вып.3 (110). – С. 534–540.
29. Доброволов, И. Ген-маркеры при рибине / И. Доброволов // Рибно стопанство. – 1980. – Т. 27, №4. – 10 с.

30. Доброволов, И. Биохимични и популяционно-генетични изследвания на промишлени видове риби от водите на България и Световния океан. Автореф. докт. дисс. / И. Доброволов – София, 1988. – 63 с.
31. Дроздов, В.В. Многолетняя изменчивость рыбопромысловых ресурсов Черного моря: тенденции, причины и перспективы / В.В. Дроздов // Ученые записки РГГУ. – 2011. – № 21. – С. 137–154.
32. Зайдинер, Ю.И. Уловы рыб и нерыбных объектов рыбохозяйственными организациями Азово-Черноморского бассейна (1990-1995 гг.). Статистический сборник. / Ю.И. Зайдинер, Л.В. Попова. – Ростов-на-Дону, изд-во «Молот», 1997. – 100 с.
33. Земельман, М.А. Метрологические основы технических измерений / М.А. Земельман. – М.: Изд-во стандартов, 1991. – 285 с.
34. Зернов, С.А. Третий отчет по исследованию рыболовства Таврической губернии / С.А. Зернов. – Севастополь, 1904. – 16 с.
35. Зернов, С.А. К вопросу об изучении жизни Чёрного моря / С.А. Зернов // Записки Императорской Академии Наук. – 1913.– Т. 2, № 1. – 287 с.
36. Зуев, Г.В. Внутривидовая дифференциация и распространение европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* в Черном и Азовском морях / Г.В. Зуев // Морской экологический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 19–31.
37. Зуев, Г.В., Популяционный подход к изучению некоторых промысловых видов черноморских рыб как основа сохранения и рационального использования их ресурсов / Г.В. Зуев, К.Д. Гуцал, А.Р. Болтачев, М.В. Чесалин, Е.Б. Мельникова // Экология моря. – 2001. – № 57. – С. 44–50.
38. Зуев, Г.В. Внутривидовая морфо-экологическая и биологическая изменчивость азово-черноморской хамсы *Engraulis encrasicolus*, зимующей у побережья Крыма / Г.В. Зуев, К.Д. Гуцал, К.Г. Горалевич, В.А. Бондарев, Ю.Л. Мурзин, Ю.В. Новоселова // Морской экологический журнал. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 5–18.

39. Зуев, Г.В. Рыбные ресурсы Черного моря (состав, состояние запасов и эксплуатация) / Г.В. Зуев, Д.К. Гуцал, Е.Б. Мельникова, В.А. Бондарев, Ю.Л. Мурзин // Гидробиологический журнал. – 2010. – Т.46, №4. – С. 16–27.
40. Зуев, Г.В. К вопросу о внутривидовой неоднородности, зимующей у побережья Крыма хамсы / Г.В. Зуев, К.Д. Гуцал, Е.Б. Мельникова, В.А. Бондарев // Рыбное хозяйство Украины. – 2007. – № 6. – С. 2–9.
41. Зуев, Г.В., Мурзин Ю.Л. Применение графического метода вероятностной бумаги для изучения внутривидовой неоднородности азово-черноморской хамсы / Г.В. Зуев, Ю.Л. Мурзин // Современные проблемы теоретической и прикладной ихтиологии: материалы II Международной ихтиологической научно-практической конференции (Севастополь, 16–19 сентября 2009 г.). – 2009. – С. 57–59.
42. Иванов, В. П. Рыбы Каспийского моря / В.П. Иванов, Г.В. Комарова. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008. – 223 с.
43. Ильин, Ю.П. Гидрометеорологические условия морей Украины. Том 1: Азовское море / Ю.П. Ильин, В.В. Фомин, Н.Н. Дьяков, С.Б. Горбач. – Севастополь, 2009. – 402 с.
44. Калнин, В.В. Биохимический полиморфизм / В.В. Калнин, О.В. Калнина, М.Б. Дашкова // Генетика. – 1984. – Т. 20, № 2. – С. 303–308.
45. Калнин, В.В. Интрогрессивная гибридизация рас и популяционная структура анчоуса Черного моря / В.В. Калнин, О.В. Калнина // Генетика. – 1985. – Т. 21, № 8. – С. 1352–1360.
46. Калнина, О.В. Генетические отличия и внутренняя гетерогенность азовской и черноморской рас анчоуса / В.В. Калнин, О.В. Калнина // Генетика. – 1984. – 20, № 2. – С. 309–313.
47. Корн, Г. Справочник по математике для научных работников и инженеров / Г. Корн, Т. Корн. – М.: Наука, 1984. – 831 с.
48. Коротков, В.П. Основы метрологии и теории точности измерительных устройств / В.П. Коротков, Б.А. Тайц. – М.: Изд. стандартов, 1978. – 352 с.

49. Кузнецов, В.А. Основы метрологии / В.А. Кузнецов, Г.В. Ялунина. – М.: Изд-во стандартов, 1995. – 230 с.
50. Лиманский, В.В. Об иммуногенетических отличиях элементарных популяций анчоуса / В.В. Лиманский, А.Н. Паюсова // Генетика. – 1969. – Т. 5, № 6. – С. 109–118.
51. Майорова, А.А. Таксономическое положение хамсы, ловимой у берегов Грузии / А.А. Майорова // Труды научной рыбохозяйственной и биологической станции Грузии. – 1934. – Т. 1. – С. 1–15.
52. Майорова, А.А. Определение возраста и возрастного состава хамсы у берегов Грузии / А.А. Майорова // Труды научной рыбохозяйственной и биологической станции Грузии. – 1939. – №2.
53. Майорова, А.А. Распределение и промысел черноморской хамсы (предварительные сообщения) / А.А. Майорова // Труды АзчерНИРО. – 1950. – № 14. – С. 11–34.
54. Майорова, А.А. Биология, распределение и оценка запаса черноморской хамсы / А.А. Майорова, Н.И. Чугунова // Тр. Всес. науч.-иссл. ин-та морск. рыбн. хоз-ва и океаногр. – 1954. – № 28. – С. 5–33.
55. Майр, Э. Принципы зоологической систематики / Э. Майр. – М. : Мир., 1971. — 454 с.
56. Майр, Э. Систематика и происхождение видов (с точки зрения зоолога) / Э. Майр. – М.: Изд-во иностр. лит., 1947. – 504 с.
57. Максимов, Н.Е. Образ жизни промысловых рыб и их ловля у берегов Болгарии и Румынии в западной части Черного моря / Н.Е. Максимов // Ежег. зоол. музея импер. Акад. Наук. – 1913. – Т. 18, № 1. – С. 1–52.
58. Малятский, С.М. К вопросу о миграциях некоторых рыб Черного моря / С.М. Малятский // Тр. научн. рыбхоз. и биолог. Станции Грузии. – 1934. – Т. 1, № 1. – С. 211–236.
59. Мастицкий, С.Э. Методическое пособие по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований / С.Э. Мастицкий. – РУП «Институт рыбного хозяйства», 2009. – 76 с.

60. Международный кодекс зоологической номенклатуры. Издание четвертое. Принят Международным союзом биологических наук: Пер. с англ. и фр. Второе, исправленное издание русского перевода. — М.: Т-во научных изданий КМК, 2004. — 223 с.
61. Мельникова, Е.Б. Размерно-возрастной ключ азово-черноморской хамсы / Е.Б. Мельникова, В.А. Бондарев, Ю.Л. Мурзин, Ю.В. Новоселова // Научные записки Тернопольского национального педагогического университета. Серия Биология. — 2010. — Т. 3, вып. 44. — С. 162–167.
62. Мельникова, Е.Б. Определение внутривидовой неоднородности хамсы с помощью метода дискриминантного анализа / Е.Б. Мельникова // Рыбное хозяйство Украины. — 2011. — № 6. — С. 55–60.
63. Нельсон, Д.С. Рыбы мировой фауны / Д.С. Нельсон. — М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2009. — 880 с.
64. Новицкий, П.В. Оценка погрешностей результатов измерений / П.В. Новицкий, И.А. Зограф. — М.: Энергоатомиздат, 1985. — 245 с.
65. Пантелеев, П.А. Концепция подвида в систематике / П.А. Пантелеев // Успехи современной биологии. — 1992. — Т. 112, №3. — С. 350–358.
66. Пантелеев, П. А. Роль температурного фактора в географическом видообразовании (на примере грызунов) / П.А. Пантелеев // Экология. — 2000. — №2 — С. 83–88.
67. Парин, Н.В. Рыбы морей России: аннотированный каталог / Н.В. Парин, С.А. Евсеенко, Е.Д. Васильева. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. — 733 с.
68. Правдин, И. Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных). 4-е изд. перер. и доп. / И.Ф. Правдин. — М.: Пищевая промышленность, 1966. — 375 с.
69. Пузанов, И.И. Материалы по промысловой ихтиологии Крыма / И.И. Пузанов // Рыбн. хозяйство. — 1923. — № 2. — С. 10–16.
70. Пузанов, И.И. Анчоус. Опыт научно-промысловой монографии / И.И. Пузанов // Уч. зап. Горьковского гос. унив. — 1936. — № 5. — С. 3–64.

71. Пузанов, И.И. О местных популяциях черноморского анчоуса / И.И. Пузанов // Научн. ежегодник Одесского гос. унив. (1956). – 1957. – С. 254–257.
72. Пузанов, И.И. О расах анчоуса, водящихся в Черном и Азовском морях / И.И. Пузанов, Я.Я. Цееб // Труды Крымского н.-и. ин-та национально-культурного строительства и краеведения. – 1926. – Т. 1, № 1. – С. 87–95.
73. Рабинович, С.Г. Погрешности измерений / С.Г. Рабинович. – Л.: Энергия, 1978. – 323 с.
74. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика. Изд. 3-е / П.Ф. Рокицкий. – Минск: Высшая школа, 1973. – 320 с.
75. Световидов, А.Н. Рыбы Черного моря. Определитель по фауне СССР / А.Н. Световидов. – М.: Наука, 1964. – 86. – 550 с.
76. Светозаров, В.В. Основы статистической обработки результатов измерений / В.В. Светозаров. – М.: МИФИ, 2005. – 40 с.
77. Сказкина, Е.П. Различия азовской и черноморской хамсы по отолитам / Е.П. Сказкина // Вопросы ихтиологии. – 1965. – Т. 5, № 4. – С. 600–605.
78. Тараненко, Н.Ф. Поведение хамсы на местах ее зимовок в Черном море / Н.Ф. Тараненко // Тр. Азово-Черн. науч.-иссл. ин-та морск. рыбн. хоз-ва и океаногр. – 1958. – № 17. – С. 111–140.
79. Тевяшова, О.Е. Влияние антропогенного воздействия на зоопланктон водоемов Азово-Донского бассейна. Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна / О.Е. Тевяшова // Сборник научных трудов АзНИ-ИРХа (1996–1997 гг.). – 1998. – С. 134–143.
80. Тейлор, Дж. Введение в теорию ошибок / Дж. Тейлор. – М.: Мир, 1985. – 272 с.
81. Тихий, М.И. Анчоус Херсонеса Таврического / М.И. Тихий // Вестник рыбопромышленности. – 1917. – № 1–3. – С. 1–41.
82. Тихий, М.И. Несколько слов об анчоусе / М.И. Тихий // Вестник рыбопромышленности. – 1914. – № 1. – С. 50–68.

83. Чашин, А.К. Соотношение групп крови в популяциях анчуса Азово-черноморского бассейна / А.К. Чашин // 10-ая Всесоюзная конференция по физиологической физиологии и биохимии рыб. – Киев: Наук. думка, 1982. – 36 с.
84. Чашин, А.К. Дифференциация промысловых стад анчоуса, оценка их запасов и перспективы использования в Черном море. Авт. дисс. канд. биол. наук. / А.К. Чашин. – М., 1990. – 20 с.
85. Чашин, А.К. Миграции скоплений и доступности черноморской хамсы для промысла в осенне-зимний период / А.К. Чашин, О.И. Акселев // Сб. науч. трудов ВНИРО: Биол. ресурсы Черного моря. – 1990. – С. 80–92.
86. Чашин, А.К. Основные результаты исследований пелагических ресурсов Азово-Черноморского бассейна / А.К. Чашин // Труды ЮгНИРО. – 1997. – № 43. – С. 60–67.
87. Чесалин, М.В. Биологическое состояние хамсы (*Engraulis encrasicolus* L.) на юго-западном шельфе Крыма в зимний период 2000-2001 гг. / М.В. Чесалин, Г.В. Зуев, С.А. Царин // Экология моря. – 2001. – № 56. – С. 13–17.
88. Чугунова, Н.И. Руководство по изучению возраста и роста рыб (методическое пособие по биологии) / Н.И. Чугунова. – М.: Изд. Академии Наук СССР, 1959. – 125 с.
89. Шварц, С. С. Экологические закономерности эволюции / С.С. Шварц. – М.: Наука, 1980. – 280 с.
90. Шевченко, Н.Ф. Географическая изменчивость анчоуса в морях средиземноморского бассейна / Н.Ф. Шевченко // Вопросы ихтиологии. – 1980. – Т. 20, вып. 1. – С. 20–31.
91. Юнёва, Т.В., Жирнокислотный состав фосфолипидов азовской хамсы *Engraulis encrasicolus maeoticus* Pusanov и черноморской хамсы *Engraulis encrasicolus ponticus* Alexandrov в промысловый период 2006-2011 гг. / А. М. Щепкина, С. А. Забелинский, В. Н. Никольский, Л. Бат, Я. Кая, К. Сейхан, Г. Е. Шульман // Морской экологический журнал. – 2013. – Т. 2, вып. 12. – С. 88 – 99.
92. Aksu, A. E. Last glacial-Holocene paleoceanography of the Black Sea and Marmara Sea: stable isotopic, foraminiferal and coccolith evidence / A. E. Aksu, R. N.

Hiscott, M. A. Kaminski, P. J. Mudie, H. Gillespie, T. Abrajano, D. Yasar // *Mar. Geol.* – 2002. – Vol. 190. – P. 119–149.

93. Allain, G. Biophysical modelling of larval drift, growth and survival for the prediction of anchovy recruitment in the Bay of Biscay (NE Atlantic) / G. Allain, P. Petitgas, P. Grellier, P. Lazure // *Fisheries Oceanography.* – 2007. – Vol. 16 (6). – P. 489–505.

94. Allain, G., The influence of environment and spawning distribution on the survival of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) larvae in the Bay of Biscay (NE Atlantic) investigated by biophysical simulations / G. Allain, P. Petitgas, P. Lazure // *Fisheries Oceanography.* – 2007. – Vol. 16 (6). – P. 506–514.

95. Allain, G., Petitgas P., Lazure P. The influence of mesoscale ocean processes on anchovy (*Engraulis encrasicolus*) recruitment in the Bay of Biscay estimated with a three-dimensional hydrodynamic model / G. Allain, P. Petitgas, P. Lazure // *Fish. Oceanogr.* – 2001. – Vol. 10. – P. 151–163.

96. Amadon, D. The seventy-five percent rule for subspecies / D. Amadon // *The Condor.* – 1949. – Vol. 51. – P. 250–258.

97. Avise, J.C. *Phylogeography: The History and Formation of Species* / J.C. Avise. – Cambridge, MA, USA: Harvard University Press, 2000. – 189 p.

98. Avise, J.C., Intraspecific Phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics / J.C. Avise, J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb, N.C. Saunders // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* – 1987. – Vol. 18. – P. 489–522.

99. Bacescu, M. The effects of geological and physic-chemical factors on the distribution of marine plants and animals in the Mediterranean. *Mediterranean Marine Ecosystems* / M. Bacescu, M. Moraitou-Apostolopoulou, V. Kiortsis. – Plenum Press, New York and London, 1985. – P. 195–212.

100. Bakun, A. *Patterns in the Ocean: Ocean Processes and Marine Population Dynamics* / A. Bacun. – California Sea Grant, in cooperation with Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, La Paz, Mexico, 1996. – pp. 323.

101. Ballard, J.W.O. The incomplete natural history of mitochondria / J.W.O. Ballard, M.C. Whitlock // *Molec. Ecol.* – 2004. – Vol. 13. – P.729–744.
102. Bandelt, H., Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies / H. Bandelt, P. Forster, A. Rohl // *Mol. Biol. Evol.* – 1999. – Vol. 16. – P. 37–48.
103. Barrowclough, G.F. Geographic variation, predictiveness, and subspecies / G.F. Barrowclough // *The Auk.* – 1982. – Vol. 99 (3). – P.601–603.
104. Barton, N.H. Analysis of hybrid zones / N.H. Barton, G.M. Hewitt // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* – 1985. – Vol. 16. – P. 113–148.
105. Barton, N.H. Genetic analysis of hybrid zones. In *Hybrid zones and the evolutionary process* (ed. RG Harrison) / N.H. Barton, K.S. Gale. – NY: Oxford University Press. 1993. – P. 13–45.
106. Bat, L. The population structure of the Black Sea anchovy / L. Bat, P. Ivanova, I. Dobrovolov, G. E. Shulman // *Aqua Culture & Fisheries.* – 2007. – №2
107. Begg, G. A. Stock identification of haddock *Melanogrammus aeglefinus* on Georges Bank based on otolith shape analysis / G.A. Begg, R.W. Brown // *Trans. Am. Fish. Res.* – 2000. – Vol. 129. – P. 935–945.
108. Bembo, D. G. Allozymic and morphometric evidence for two stocks of the European anchovy *Engraulis encrasicolus* in Adriatic waters / D.G. Bembo, G. R. Carvalho, N. Cingolani, E. Arneri, G. Giannetti, T. J. Pitcher // *Marine Biology.* – 1996. – Vol. 126. – P. 529–538.
109. Bembo, D. G. Electrophoretic analysis of stock structure in Northern Mediterranean anchovies *Engraulis encrasicolus* / D.G. Bembo, G. R. Carvalho, N. Cingolani, T. J. Pitcher // *ICES J. Mar. Sci.* – 1996. – Vol. 53. – P. 115–128.
110. Blier, P.U., Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation / P.U. Blier, F. Dufresne, R.S. Burton // *TRENDS in Genetics.* – 2001. – Vol. 17(7). – P. 400–406.
111. Blier, P.U. The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria / P.U. Blier, H. Lemieux // *J. Comp. Physiol B.* – 2001. – Vol. 171. – P. 247–253.

112. Borja, A., Uriarte A., Egana J., Motos L., Valencia V. Relationships between anchovy (*Engraulis encrasicolus*) recruitment and environment in the Bay of Biscay (1967 – 1996) / A. Borja, A. Uriarte, J. Egana, L. Motos, V. Valencia // Fish. Oceanogr. – 1998. – Vol. 7. – P. 375–380.
113. Borrell, J.J. Mitochondrial DNA and microsatellite genetic differentiation in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* / J.J. Borrell, J.A. Pinera, J.A. Sanchez Prado, A. Blanco // ICES Journal of Marine science. – 2012. – Vol. 69(8). – P. 1357–1371.
114. Borsa, P. Allozyme, mitochondrial-DNA and morphometric variability indicate cryptic species of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) / P. Borsa // Biological Journal of the Linnean Society. – 2002. – Vol. 75. – P. 261–269.
115. Borsa, P., Nuclear-DNA markers confirm the presence of two anchovy species in the Mediterranean / P. Borsa, A. Collet, J.-D. Durand // Comptes Rendus Biologies. – 2004. – Vol. 327. – P. 1113–1123.
116. Bouchenak-Khelladi Y. Geographic structure of European anchovy: A nuclear-DNA study / Y. Bouchenak-Khelladi, J.-D. Durand, A. Magoulas, P. Borsa // Journal of Sea Research. – 2008. – Vol. 59. – P. 269–278.
117. Briggs, J. C. Global Biogeography / J.C. Briggs. – Elsevier, New York, 1995. – pp. 451.
118. Campana, S. E. Stock discrimination using otolith shape analysis / S.E. Campana, J. M. Casselman // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1993. – Vol. 50. – P. 1062–1083.
119. Campana, S. E., Microstructure of fish otoliths / S.E. Campana, J. D. Neilson // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1985. – Vol. 42. – P. 1014–1032.
120. Cardinale, M. Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths / M. Cardinale, P. Doering-Arjes, M. Kastowsky, H. Mosegaard // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 2004. – Vol. 61. – P. 158–167.
121. Castilho, R. The European anchovy, a genetically highly diverse species displays null within-sample haplotype diversity on a single study? / R. Castilho, G. Silva // Mitochondrial DNA Part B: Resources. – 2016. – Vol. 1 (1). – P. 66–67.

122. Chapuis, M. P. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation / M. P. Chapuis, A. Estoup // *Mol. Biol. Evol.* – 2006. – Vol. 24. – № 3. – P. 621–631.
123. Chashchin, A.K. The Black Sea populations of anchovy / A.K. Chashchin // *Scientia Marina.* – 1996. – Vol. 60 (2). – P. 219–225.
124. Chlaida, M., Evidence of a genetic cline for *Sardina pilchardus* along the northwest African coast / M. Chlaida, V. Laurent, S. Kifani, T. Benazzou, H. Jaziri, S. Planes // *ICES J. Mar. Sci.* – 2009. – Vol. 66. – P. 264–271.
125. Claireaux, G. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass / G. Claireaux, J.-P. Lagardere // *Journal of Sea Research.* – 1999. – Vol. 42(2). – P. 156–168.
126. Danilevsky, N. N. Spring migration of the Black Sea anchovy in 1959 and adaptive peculiarities of its spawning populations / N.N. Danilevsky // *Proc. Azov-Black Sea Mar. Sci. Res. Inst. Fish. Oceanogr.* – 1961. – Vol. 19. – P. 75–87.
127. Degens, E. T. Chronology of the Black Sea over the last 25,000 years / E.T. Degens, D.A. Ross // *Chem. Geol.* – 1972. – Vol. 10. – P. 1–16.
128. Demir, N. Synopsis of biological data on anchovy *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus) 1758 (Mediterranean and adjacent seas) / N. Demir // *FAO Fisheries Synopsis.* – 1965. – Vol. 26(1). – P. 1–42.
129. Demir, N. The pelagic eggs and larvae of teleostean fishes in Turkish waters, II / N. Demir // *Engraulidae. Istanbul Univ. Fen Fak. Mec., Seri B.* – 1974. – Vol. 39 (1–2). – P. 49–66.
130. Dobrovolov, I. Multiple forms of lactate dehydrogenase in anchovy from the Black Sea, the Sea of Azov and the Atlantic Ocean / I. Dobrovolov // *Докл. Болг. АН.* – 1976. – Vol. 29 (6). – С. 877–880.
131. Dobrovolov, I. Study of the intraspecific divergence of anchovy *Engraulis encrasicolus* L. / I. Dobrovolov // *Доклады болгарской АН.* – 1992. – Т. 45, № 2. – С. 63–65.

132. Drummond, A. J. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences / A. J. Drummond, A. Rambaut, B. Shapiro, O. G. Pybus // *Molecular Biology and Evolution*. – 2005. – Vol. 22. – P. 1185–1192.
133. Dulcic, J. Growth of anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L), larvae in the northern Adriatic Sea / J. Dulcic // *Fish. Res.* – 1997. – Vol. 31. – P. 189–195.
134. Ekman, S. *Zoogeography of the Sea* / S. Ekman. – Sidgwick and Jackson: London, 1953. – 417 pp.
135. Elliott, J. M. The energetics of feeding, metabolism and growth of brown trout (*Salmo trutta* L.) in relation to body weight, water temperature and ration size / J.M. Elliott // *J. Anim. Ecol.* – 1976. – Vol. 45. – P. 923 – 948.
136. Evanno, G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study / G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet // *Mol. Ecol.* – 2005. – Vol. 14. – P. 2611–2620.
137. Fage, L. Recherches sur la biologie de l'anchois *Engraulis encrasicolus* / L. Fage // *Ann. Inst. Oceanography*. – 1911. – Vol. 2 (4). – P. 1–40.
138. Falush, D. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies / D. Falush, M. Stephens, J. K. Pritchard // *Genetics*. – 2003. – Vol. 164. – P. 1567–1587.
139. Fricke, R. *ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES* / R. Fricke, W.N. Eschmeyer, R. Van der Laan // Electronic version. – 2019.  
(<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>)
140. Fu, Y. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection / Y. Fu // *Genetics*. – 1997. – Vol. 147. – P. 915–925.
141. Funamoto, T. Reproductive ecology of Japanese anchovy off the Pacific coast of eastern Honshu, Japan / T. Funamoto, I. Aoki // *J. Fish Biol.* – 2002. – Vol. 60. – P. 154–169.

142. Galtier, N. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal / N. Galtier, B. Nabholz, S. Glemin, G.D.D. Hurst // *Molecular Ecology*. – 2009. – Vol. 18. – P. 4541–4550.

143. Garcia, H. E. Volume 3: Dissolved Oxygen, Apparent Oxygen Utilization, and Oxygen Saturation. / H.E. Garcia, R.A. Locarnini, T.P. Boyer, J.I. Antonov, O.K. Baranova, M.M. Zweng, J.R. Reagan, D.R. Johnson // *World Ocean Atlas 2013*, S. Levitus, Ed., A. Mishonov. – Technical Ed.; NOAA Atlas NESDIS 75, 2014. – 27 pp.

144. Garcia, H. E., Volume 4: Dissolved Inorganic Nutrients (phosphate, nitrate, silicate) / H.E. Garcia, R.A. Locarnini, T.P. Boyer, J.I. Antonov, O.K. Baranova, M.M. Zweng, J.R. Reagan, D.R. Johnson // *World Ocean Atlas 2013*, S. Levitus, Ed. A. Mishonov. – Technical Ed.; NOAA Atlas NESDIS 76, 2014. – 25 pp.

145. Garcia, A. Anchovy early life history and its relation to its surrounding environment in the Mediterranean basin / A. Garcia, I. Palomera // *Sci. Mar.* – 1996. – Vol. 60 (2). – P. 155–166.

146. Garvin, M.R. Positive Darwinian selection in the piston that powers proton pumps in complex I of the mitochondria of pacific salmon / M.R. Garvin, J.P. Bielawski, A.J. Gharrett // *PloS ONE: Evolution of mitochondrial DNA in Salmonids*. – 2011. – Vol. 6(9). – P. 1–15.

147. Gordina, A. D. New data on the morphological differences of anchovy eggs (*Engraulis encrasicolus* L) in the Black Sea / A. D. Gordina, V. N. Nikolskiy, U. Niermann, F. Bingel, A.A. Subbotin // *Fisheries Research*. – 1997. – Vol. 31. – P. 139–145.

148. Grant, W. S. Biochemical genetic stock structure of the southern African anchovy *Engraulis capensis* Gilchrist / W.S. Grant // *J. Fish Biol.* – 1985. – Vol. 27. – P. 23–29.

149. Grant, W. S. A second look at mitochondrial DNA variability in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*): assessing models of population structure and the Black Sea isolation hypothesis / W.S. Grant // *Genetica*. – 2005. – Vol. 125. – P. 293–309.

150. Grant, W. S. Molecular genetic assessment of bipolarity in the anchovy genus *Engraulis* / W.S. Grant, R. W. Leslie, B. W. Bowen // Journal of Fish Biology. – 2005. – 67. – P. 1242–1265.
151. Grant, W. S. Biogeographic evidence for selection on mitochondrial DNA in north Pacific walleye pollock *Theragra chalcogramma* / I.B. Spies, M.F. Canino // J. Hered. – 2006. – Vol. 97 (571). – P. 571–580.
152. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T.A. Hall // Nucleic Acids Symposium Series. – 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
153. Hsu, K.J. When the Black Sea was drained / K.J. Hsu // Scientific American. – 1978. – Vol. 238. – P. 52–63.
154. Hsu, K.J. The origin of Mediterranean evaporates / K.J. Hsu, M.B. Cita, W.B.F. Ryan // Init. Repts. Deep Sea Drill. Proj. – 1973. – Vol. 13. – P. 1203–1231.
155. Hsu, K. J. History of the Mediterranean salinity crisis / K. J. Hsu, L. Mondatert, D. Bernoulli, M. B. Cita, A. Erickson, R. E. Garrison, R. B. Kidd, F. Melieres, C. Muller, R. Wright // Init. Repts. Deep Sea Drill. Proj. – 1978. – Vol. 42. – P. 1053–1078.
156. Ho, S.Y.W. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences / S.Y.W. Ho, B. Shapiro // Molecular Ecology Resources. – 2011. – Vol. 11. – P. 423–434.
157. Ivanov, L. The fisheries resources of the Mediterranean. Part two: Black Sea / L Ivanov, R.J.H. Beverton // GFCM, Studies and Review. – Rome: FAO, 1985. – 135 p.
158. Ivanova, P.P. Population-genetic structure on European anchovy (*Engraulis encrasicolus* Linnaeus, 1958) (Osteichthyes: Engraulidae) from Mediterranean Basin and Atlantic Ocean / P.P. Ivanova, I. Dobrovolov // Acta Adriat. – 2006. – Vol. 47 (1). – P. 13-22.
159. Ivanova, P.P. Application of esterase polymorphism to specify population genetic structure of *Engraulis encrasicolus* (Pisces: Engraulidae) in the Black and Azov Seas / P.P. Ivanova, I. Dobrovolov, L. Bat, A.E. Kideys, V.N. Nikolsky, T.V. Yuneva,

A.M. Shchepkina, G.E. Shulman // Морской экологический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 45–52.

160. Jemaa, S. Evidence for population complexity of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) along its distributional range / S. Jemaa, M. Bacha, G. Khalaf, R. Amara // Fisheries Research. – 2015. – 168. – P. 109–116.

161. Jemaa, S. What can otolith shape analysis tell us about population structure of the European sardine, *Sardine pilchardus*, from Atlantic and Mediterranean waters? / S. Jemaa, M. Bacha, G. Khalaf, D. Dessailly, K. Rabhi, R. Amara // J. Sea Res. – 2015. – Vol. 96. – P. 11–17.

162. Junquera, S. Population diversity in Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) as revealed by multivariate analysis of morphometric and meristic characters / S. Junquera, G. Perez-Gandaras // ICES J. Mar. Sci. – 1993. – Vol. 50. – P. 383–391.

163. Karahan, A. Geometric morphometrics, Fourier analysis of otolith shape, and nuclear-DNA markers distinguish two anchovy species (*Engraulis* spp.) in the Eastern Mediterranean Sea / A. Karahan, P. Borsa, A.C. Gucu, I. Kandemir, E. Ozkan, Y. Ak Orek, S. Can Acan, E. Koban, I. Togan // Fisheries Res. – 2014. – Vol. 159. – P. 45–55.

164. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // Journal of Molecular Evolution. – 1980. – Vol. 16. – P. 111–120.

165. Kinsey, S.T. Population structure of the Spanish sardine *Sardinella aurita*: natural morphological variation in a genetically homogeneous population / T. Orsoy, T. M. Bert, B. Mahmoudi // Mar. Biol. – 1994. – Vol. 118. – P. 309–317.

166. Kocatas, A., Review of the Fishery Resource and Their Environment in the Marmara Sea / A. Kocatas, T. Koray, M. Kaya, O.F. Kara // Studies and Reviews Fisheries and Environment Studies in the Black Sea System, FAO, Rome. – 1993. Vol. 64 – P. 87–143.

167. Kristoffersen, J.B., Magoulas A. Population structure of anchovy *Engraulis encrasicolus* L. in the Mediterranean Sea inferred from multiple methods / J.B. Kristoffersen, A. Magoulas // *Fish. Res.* – 2008. – Vol. 91. – P. 187 – 195.
168. Leary, R.F. Developmental stability and high meristic counts in interspecific hybrids of salmonid fishes / R.F. Leary, F.W. Allendorf, K.L. Knudsen // *Evolution.* – 1985. – Vol. 39. – P. 1318–1326.
169. Lee, J.-Y. Observations morphologiques et biologiques sur les anchois (*Engraulis encrasicolus*) du golfe du Lion / J.-Y. Lee, C. Juge // *Rapports et Procès-Verbaux des Réunions de la Commission Internationale Pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée.* – 1965. – Vol. 18. – P. 221–224.
170. Levi, D. Otolith reading as a tool for stock identification / D. Levi, M.G. Andreoli, E. Arneri, G. Gianetti, P. Rizzo // *Fisheries Research.* – 1994. – Vol. 20. – P. 97–107.
171. Librado, P. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data / P. Librado, J. Rozas // *Bioinformatics.* – 2009. – Vol. 25. – P. 1451–1452.
172. Lisovenko, L. A. Reproductive biology of anchovy (*Engraulis encrasicolus ponticus* Alexandrov 1927) in the Black Sea / L.A. Lisovenko, D.P. Andriyanov // *Sci. Mar.* – 1996. – Vol. 60 (2). – P. 209–218.
173. Locarnini, R.A. Volume 1: Temperature. S. / R.A. Locarnini, A.V. Mishonov, J.I. Antonov, T.P. Boyer, H.E. Garcia, O.K. Baranova, M.M. Zweng, C.R. Paver, J.R. Reagan, D.R. Johnson, M. Hamilton, and D. Seidov // *World Ocean Atlas 2013* Levitus, Ed., A. Mishonov. – Technical Ed.; NOAA Atlas NESDIS 73, 2013. – 40 pp.
174. Magoulas, A. Mitochondrial DNA reveals a mosaic pattern of phylogeographical structure in Atlantic and Mediterranean populations of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) / A. Magoulas, R. Castilho, S. Caetano, S. Marcato, T. Patarnello // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* – 2006. – Vol. 39. – P. 734–746.
175. Magoulas, A. Mitochondrial DNA phylogeny and the reconstruction of the population history of a species: the case of European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) /

A. Magoulas, N. Tsimenides, E. Zouros // Mol. Biol. Evol. – 1996. – Vol. 13(1). – P. 178–190.

176. Magoulas, A. Restriction-Site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA / A. Magoulas, E. Zouros // Mol. Biol. Evol. – 1993. – Vol. 10 (2). – P. 319–325.

177. Miller, S.A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells / S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky // Nucleic Acids Research. – 1988. – Vol. 16. – P. 1215.

178. Motos, L. The spawning environment of the Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) / L. Motos, A. Uriarte, V. Valencia // Scientia Marina. – 1996. – Vol. 60. – P. 117–140.

179. Nei, M. Genetic distance and molecular phylogeny. Population genetics and fishery management / M. Nei. – USA: the University of Washington, 1987. – 420 p.

180. Neves, A., Discriminating bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (Pisces: Sebastidae), stocks in Portuguese waters by means of otolith shape analysis / A. Neves, V. Sequeira, I. Farias, A. R. Vieira, R. Paiva, L. S. Gordo // J. Mar. Biol. Assoc. U. K. – 2011. – Vol. 91. – P. 1237–1242.

181. Niermann, U. Distribution of anchovy eggs and larvae (*Engraulis encrasicolus* Cuv.) in the Black Sea in 1991–1992 / U. Niermann, F. Bingel, A. Gorban, A.D. Gordina, A.C. Gucu, A.E. Kideys, A. Konsulov, G. Radu, A.A. Subbotin, V.E. Zaika // ICES J. Mar. Sci. – 1994. – Vol. 51(4). – P. 395–406.

182. Ninua, N.Sh. Check list of fishes of Georgia / N.Sh. Ninua, B.O. Japoshvili // Proceedings of the Institute of Zoologia of Georgia. – 2008. – Vol. 23. – P. 163–176.

183. O'Brien, S.J. 1991. Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies / S.J. O'Brien, E. Mayer // Science. – 1991. – Vol. 251, (4998). – P.1187–1188.

184. O'Connell, C. P., Raymond L. P. The effect of food density on survival and growth of early post-larvae of northern anchovy (*Engraulis mordax* Girard) in the laboratory / C.P. O'Connell, L.P. Raymond // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1970. – Vol. 5. – P. 187–197.

185. Ouazzani, K.C. Mitochondrial phylogenomics and genetic population structure of anchovies (*Engraulis encrasicolus*) along the Moroccan coast using sequence analysis of the mitochondrial DNA cytochrome b / K.C. Ouazzani, T. Benazzou, N. Tojo, M. Chlaida // PeerJ PrePrints. – 2015. – Vol. 3. – C. e1923.
186. Oueslati, S. Existence of two widespread semi-isolated genetic entities within Mediterranean anchovies / S. Oueslati, K. Fadhlaoui-Zid, O. Kada, M. T. Augé, J. P. Quignard, F. Bonhomme // Marine Biology. – 2014. – Vol. 161. – P. 1063–1071.
187. Ozturk, B. Some remarks on the catches of anchovy, *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758), in Georgian waters by Turkish fleet between 2003 and 2009 / B. Ozturk, C. Keskin, S. Engin // J. Black Sea/Mediterranean Environment. 2011. – Vol. 17(2). – P. 145–158.
188. Pakaki, V. New polymorphic microsatellite loci for population studies in the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.) / V. Pakaki, A. Magoulas, P. Kasapidis // Molecular Ecology Resources. – 2009. – Vol. 9. – P. 1406–1409.
189. Palomera, I. Vertical distribution of eggs and larvae of *Engraulis encrasicolus* in stratified waters of the western Mediterranean / I. Palomera // Marine Biology. – 1991. – Vol. 111. – P. 37–44.
190. Pappalardo, A. M. A COI nonsynonymous mutation as diagnostic tool for intraspecific discrimination in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus) / A. M. Pappalardo, C. Federico, G. Sabella, S. Saccone, V. Ferrito // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10(11): e0143297.
191. Parada, C. Modelling the effect of buoyancy on the transport of anchovy (*Engraulis capensis*) eggs from spawning to nursery grounds in the southern Benguela: an IBM approach / C. Parada, C. D. Van der Lingen, C. Mullon, P. Penven // Fisheries Oceanography. – 2003. – Vol. 12. – P. 170–184.
192. Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P. E. Smouse // Mol. Ecol. Res. – 2006. – Vol. 6. – № 1. – P. 288-295.

193. Plotnikov, I.S. An overview of hybrid marine and lacustrine seas and saline lakes of the world / I.S. Plotnikov, N.V. Aladin // *Lakes & Reservoirs: Research and Management*. – 2011. – Vol. 16. – P. 97–108.
194. Popescu, I. Fisheries in the Black Sea / I. Popescu. – Brussels: European Parliament, 2010. – 69 p.
195. Por, F.D. Lessepsian Migrations: The Influx of Red Sea Biota into the Mediterranean by Way of the Suez Canal. *Ecological Studies*. / F.D. Por. – Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1978. – 228 pp.
196. Por, F.D., Continuity of Messinian biota in the Mediterranean basin / F.D. Por, C. Dimentman, // *Geological Evolution of the Mediterranean Basin*. D.J. Stanley, F.C. Wezel. – Springer-Verlag, Berlin. – 1985. – P. 545–557.
197. Quignard, J.-P. La Méditerranée creuset ichthyologique / J.-P. Quignard // *Bolletín Zoologico*. – 1978. – Vol. 45. – P. 23–36.
198. Quintela, M. AFLPs and Mitochondrial Haplotypes Reveal Local Adaptation to Extreme Thermal Environments in a Freshwater Gastropod / M. Quintela, M.P. Johansson, B.K. Kristjansson, R. Barreiro, A. Laurilla // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9(7). – P. 1–12.
199. Rambaut, A. Tracer v1.4 – 2007 / A. Rambaut, A.J. Drummond // Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
200. Ray, N. Intra – deme molecular diversity in spatially expanding populations / N. Ray, M. Currat, L. Excoffier // *Mol. Biol. Evol.* – 2003. – Vol. 20 (1). – P. 76–86.
201. Regner, S. Effects of environmental changes on early states and reproduction of anchovy in the Adriatic Sea / S. Regner // *Sci. Mar.* – 1996. – 60 (2). – P. 167–177.
202. Rogers A.R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences / A.R. Rogers, H. Harpending // *Molecular Biology and Evolution*. – 1992. – Vol. 9. – P. 552–569.
203. Rosenberg, N.A. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds / N.A. Rosenberg, T. Burke, K. Elo, M.W. Feldman, P.J. Freidlin, M.A. Groenen, J. Hillel, A. Maki-Tanila, M. Tixier-Boichard, A. Vignal, K. Wimmers, S. Weigend // *Genetics*. – 2001. – Vol. 159. – P. 699–713.

204. Ryman, N. Lack of correspondence between genetic and morphologic variability patterns in Atlantic herring (*Clupea harengus*) / N. Ryman, U. Lagercrantz, L. Andersson, R. Chakraborty, R. Rosenberg // *Heredity*. – 1984. – Vol. 53. – P. 687–704.
205. Sanz, N. Spawning groups of European anchovy: population structure and management implications / N. Sanz, J.-L. Garcia-Marin, J. Vinas, M. Roldan, C. Pla // *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*. – 2008. – Vol. 65 (9). – P. 1635–1644.
206. Sara, M. Ecological factors and their biogeographic consequences in the Mediterranean ecosystems / M. Sara, M. Moraitou-Apostolopoulou, V. Kiortsis. – *Mediterranean Marine Ecosystems*. Plenum Press, New York and London, 1985. – P. 1–17.
207. Selli, R. Evolution of the Tyrrhenian Sea / R. Selli, D.J. Stanley, F.C. Wezel. – *Geological Evolution of the Mediterranean Basin*. Springer-Verlag, Berlin, 1985. – P. 131–151.
208. Shevchenko, N.F. Geographical variability of the anchovy *Engraulis encrasicolus* (Clupeiformes, Engraulidae), in the Mediterranean Basin / N.F. Shevchenko // *J. Ichthyol.* – 1981. – Vol. 20. – P. 15–24.
209. Shlyakhov, V. Scientific data on the state of the fisheries resources of Ukraine in the Black Sea in 1992—2005 / V. Shlyakhov, Z. Charova // *Com. Project: Black Sea against pollution, 1 Biannual Sci. Conf. Black Sea Ecosystem 2005 and Beyond: Report Thesis.*, Istanbul, Turkey, 8—10 May, 2006. – P. 131—134.
210. Shulman, G.E. Anchovies of the Sea of Azov and the Black Sea: regularities of wintering migrations (brief review) / G.E. Shulman // *Морской экологический журнал*. – 2002. – Т. 1, №1. – С. 67 – 77.
211. Silva, G. Anchovies go north and west without losing diversity: post-glacial range expansions in a small pelagic fish / G. Silva, J.B. Horne, R. Castilho // *Journal of Biogeography*. – 2014. – Vol. 41. – P. 1171–1182.
212. Silva, G. Thermal adaptation and clinal mitochondrial DNA variation of European anchovy / G. Silva, F. Lima, P. Martel, R. Castilho // *Proceedings of the Royal Society B (biological sciences)*. – 2014. – Vol. 281. – P. 1–9.

213. Stransky, C., Otolith shape analysis as a tool for stock separation of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean / C. Stransky, A. G. Murta, J. Schlickeisen, C. Zimmermann // *Fish. Res.* – 2008. – Vol. 89. – P. 159–166.
214. Sundby, S. Turbulence and ichthyoplankton: influence on vertical distributions and encounter rates / S. Sundby // *Sci. Mar.* – 1997. – Vol. 61 (1). – P. 159–176.
215. Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism / F. Tajima // *Genetics.* – 1989a. – Vol.122. – P. 585–595.
216. Tajima, F. The effect of change in population size on DNA polymorphism / F. Tajima // *Genetics.* – 1989b. – Vol. 123. – P. 597–601.
217. Tamura, K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski, S. Kumar // *Molecular biology and evolution.* – 2013. – Vol. 30. – P. 2725–2729.
218. Taning, A.V. Experimental study of meristic characters in fishes / A.V. Taning // *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* – 1952. – Vol. 27. – P. 169–193.
219. Teacher, A. Whole mitochondrial genome scan for population structure and selection in the Atlantic herring / A. Teacher, C. Andre, J. Merila, C. Wheat // *BMC Evol. Biol.* – 2012. – 12. – P. 248.
220. Thorpe, R.S. Geographic variation and population systematics: distinguishing between ecogenetics and phylogenetics / R.S. Thorpe, R.P. Brown, A. Malhorta, W. Wuster // *Boll. Zool.* – 1991. – V. 58 – P. 329-335.
221. Tintore, J. A study of an intense density front in the eastern Alboran Sea: the Almeria–Oran front / J. Tintore, P.E. LaViolette, I. Blade, A. Cruzado // *Journal of Physical Oceanography.* – 1988. – 18. – P. 1384–1397.
222. Tortonese, E. Distribution and ecology of endemic elements in the Mediterranean fauna (fishes and echinoderms) / M. Moraitou-Apostolopoulou, V. Kiortsis // *Mediterranean Marine Ecosystems.* Plenum Press, New York and London., 1985. – P. 57–83.

223. Tudela, S. Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* / S. Tudela // Fisheries Research. – 1999. – Vol. 42. – P. 229–243.
224. Tudela, S. Genetic structure of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus* L., in the north-west Mediterranean / S. Tudela, J. L. Garcia-Marin, C. Pla // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 1999. – Vol. 234. – P. 95–109.
225. Velichko, A.A. Late Pleistocene spatial paleoclimatic reconstructions / A.A. Velichko // Late Quaternary Environments of the Soviet Unionin, Longmann, Essex. – 1984. – P. 261–285.
226. Vignon, M. Ontogenetic trajectories of otolith shape during shift in habitat use: interaction between otolith growth and environment / M. Vignon // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 2012. – Vol. 420. – P. 26–32.
227. Vinarski, M.V. The steppe relics: taxonomic study on two lymnaliol species endemic to the former USSR (Ciastrapoda: Pulmonata: Lymnalidae Arch. Mollusk) M.V. Vinarski, K. Schmebs, P. Gloer, M.O. Son, A.A. Hundsdoerfer // International Journal of malacology. – 2012. – Vol. 141, (1). – P.67-85
228. Vinas, J. Genetic population structure of European anchovy in the Mediterranean Sea and the Northeast Atlantic Ocean using sequence analysis of the mitochondrial DNA control region / J. Vinas, N. Sanz, L. Penarrubia, R.-M. Araguas, J.-L. Garcia-Marin, M.-I. Roldan, C. Pla // ICES Journal of Marine Science. – 2014. – Vol. 71(2) – P. 391–397.
229. Vinas, J. Phylogeography of the Atlantic bonito (*Sarda sarda*) in the northern Mediterranean^ the combined effects of historical vicariance, population expansion, secondary invasion, and isolation by distance / J. Vinas, J. Alvarado Bremer, C. Pla // Mol. Phylogenet. Evol. – 2004. – Vol. 33. – P. 32–42.
230. Waples, R.S. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species / R.S. Waples // Journal of Heredity. – 1998. – Vol. 89. – P. 438–450.

231. Whitehead, P.J.P. FAO species catalogue. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). Part 2 – Engraulidae / P.J.P. Whitehead, G.J. Nelson, T. Wongratana // FAO Fisheries Synopsis. – 1988. – Vol. 7. – P. 305–579.
232. Willett, C.S. Evolution of Interacting Proteins in the Mitochondrial Electron Transport System in a Marine Copepod / C.S. Willett, R.S. Burton // Molecular Biology and Evolution. – 2004. – Vol. 21(3). – P. 443–453.
233. William, J. The incomplete natural history of mitochondria / J. William, O. Ballard, M.C. Whitlock // Molecular Ecology. – 2004. – Vol. 13. – P. 729–744.
234. Wilson, E.O. The subspecies concept and its taxonomic application / E.O. Wilson, W.L. Brown // Syst. Zool. – 1953. – Vol. 2. – P. 97–111.
235. Winston, J.E. 1999 Delimiting species: practical taxonomic procedure for biologists / J.E. Winston. – N.Y.: Columbia Univ. Press, 1999. – 518 p.
236. Wright, S. The genetical structure of population / S. Wright // Ann. Eugen. – 1951. – Vol. 15. – P. 323–354.
237. Yanina, T.A., The Ponto-Caspian region: Environmental consequences of climate change during the Late Pleistocene / T.A. Yanina // Quaternary International. – 2014. – Vol. 30. – P. 1–12.
238. Zarraonaindia, I. Multiple SNP Markers Reveal Fine-Scale Population and Deep Phylogeographic Structure in European Anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) / I. Zarraonaindia, M. Iriondo, A. Albaina, M.A. Pardo, C. Manzano, W.S. Grant, X. Irigoien, A. Estonba // PLOS ONE. – 2012. – Vol. 7(7). – e42201.
239. Zink, R.M., 2004, The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy / R.M. Zink // Proc. R. Soc. Lond. Series B. – 2004. – Vol.271 – P.561-564.
240. Zweng, M.M Volume 2: Salinity. / J.R. Reagan, J.I. Antonov, R.A. Locarnini, A.V. Mishonov, T.P. Boyer, H.E. Garcia, O.K. Baranova, D.R. Johnson, D. Seidov, M.M. Biddle // World Ocean Atlas 2013, S. Levitus, Ed., A. Mishonov. – Technical Ed.; NOAA Atlas NESDIS 74, 2013. – 39 pp.