

На правах рукописи

ВОДЯСОВА
Екатерина Александровна

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

03.02.06
ИХТИОЛОГИЯ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Севастополь
2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Федеральном исследовательском центре Института биологии южных морей
им. °А.О.°Ковалевского Российской академии наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Абрамсон Наталья Иосифовна

Официальные оппоненты:

Васильева Екатерина Денисовна,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
Научно-исследовательского зоологического музея
Биологический факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

Махров Александр Анатольевич,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
лаборатории экологии водных сообществ и инвазий
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института проблем экологии и эволюции
имени А. Н. Северцова Российской академии наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования **Керченский государственный
морской технологический университет** (г. Керчь)

Защита состоится « » 2021 г. в « » часов « » на заседании
диссертационного совета Д002.213.02 при Федеральном государственном бюджетном
учреждении науки Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова
Российской академии наук в конференц-зале ОБН РАН по адресу: 119071, г. Москва,
Ленинский проспект, д. 33.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ОБН РАН, на сайте
ИПЭЭ РАН по адресу: <http://www.sev-in.ru/>, с авторефератом на сайте ВАК РФ по адресу:
<http://www.minobrnauki.gov.ru/>.

Автореферат диссертации разослан « » 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
к.б.н.

Кацман Елена Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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 (García, Palomera, 1996; Lisovenko, Andrianov, 1996; Dulcic, 1997; Војта 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, Цеев, 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) (Borrell et al., 2012; Pakaki et al., 2009 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 подвигов *E. e. ponticus* и *E. e. traoticus* базировались на морфологических и биохимических данных (Алтухов, 1969; Алтухов и др., 1969; Доброволов, 1978; Зуев, 2014; Калнин, Калнина, Дашкова, 1984; Лиманский, Паюсова, 1969; Ivanova, Dobrovolo, 2006). Были изучены меристические и морфометрические признаки, оценивалась степень зараженности паразитами, проводился анализ белкового полиморфизма. Для идентификации азовской и черноморской хамсы в настоящее время используется только один морфологический критерий – индекс отолитов (Сказкина, 1965). Молекулярно-генетические методы анализа нуклеотидных последовательностей в изучении дифференциации и генеалогии данных подвигов в Черном и Азовском морях ранее не применялись. Необходимо восполнить данный пробел, чему и посвящена данная 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 подвигов.
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.

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. 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 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 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. Балушкину, зав. отделом ихтиологии ФГБУН ИМБИ Г.В. Зуеву, зав. лабораторией генетических исследований 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».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава представлена тремя разделами. В первом разделе описана биология европейского анчоуса *E. encrasicolus* (Linnaeus, 1758), дана характеристика его современного ареала, рассмотрена внутривидовая структура и подвидовая систематика. Особое внимание уделено двум подвидам *E. e. ponticus* Aleksandrov и *E. e. maeoticus* Puzanov, обитающим в Азово-Черноморском регионе, их дифференциации, особенностям миграций и сложности их идентификации. Во втором разделе подробно описана история изучения европейского анчоуса с помощью молекулярно-генетических методов и его филогеография на территории Атлантики и Средиземноморья. В последнем разделе затрагивается вопрос об адаптивности наблюдаемой изменчивости митохондриальных генов у европейского анчоуса.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Исследованный материал

Материал был собран автором в 2009 – 2016 годах из различных точек Азовского и Черного морей (Таблица 1). Некоторые рассмотренные особи были из зоологической коллекции ЗИН РАН. Для филогенетического анализа на всем ареале вида было взято 102 нуклеотидные последовательности европейского анчоуса из банка генетических данных GenBank.

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

№	Место сбора	Время сбора	Число проб, морфология	Число проб, <i>cytb</i>	Число проб, 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	Баргын	Июль 2015	21	0	15
21	м. Лукул	Декабрь 2015	51	0	50
22	Азовское море (N46° 37'8'' E37° 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
Всего			799	84	288

Для генетических исследований отбиралась белая спинная мышца и спинной плавник, ткани фиксировались в 96% этаноле и хранились при температуре -20°C . 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 отоциты *sagitta*.

2.2. Морфологический анализ

В качестве морфологических показателей измерялись стандартная длина тела – длина без хвостового плавника (SL), длина отоцита (l), ширина отоцита (d), индекс отоцита (l/d) и угол отоцита, характеризующий открытие центральной борозды отоцита (β).

2.3. Генетические лабораторные методы

Выделение ДНК проводилось из белой мышечной ткани с помощью метода солевой экстракции или стандартного набора «ДНК-сорб-А» (Россия). Секвенирование фрагмента митохондриального гена цитохрома b (*cytb*) проводилось в обоих направлениях с использованием стандартного набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc.). Для изучения популяционной структуры европейского анчоуса были взяты десять микросателлитных локусов (Pakaki et al., 2009). Фрагментный анализ проводился на анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc.). Мультиплексы готовились с использованием меченных праймеров краской FAM, HEX, TAMRA. Последующее определение аллелей микросателлитных локусов различной длины проводилось с использованием программы GeneMarker.

Работы с мт геном *cytb* проводились на базе лаборатории молекулярной систематики ЗИН РАН (г. Санкт-Петербург). Работы с микросателлитными локусами проводились на базе лаборатории молекулярной генетики ВНИРО (г. Москва).

2.4. Филогенетический и популяционно-генетический анализы

Полученные фрагменты *cytb* выравнивались в программе BioEdit с обязательной доводкой вручную. В программе DnaSP 5.0 рассчитывались гаплотипическое (Hd) и нуклеотидное (Pi) разнообразие, их стандартные отклонения и значение индекса фиксации F_{st} . Строился график попарных нуклеотидных различий, рассчитывалось значение τ для экспансивной модели популяции. Оценка времени начала роста популяции проводилась по формуле предложенной Rogers. Скорость мутации для *cytb* у европейского анчоуса $0,02 \cdot 10^{-6}$. Для оценки межгрупповой генетической дифференциации рассчитаны генетические дистанции D_{xy} . Нейтральность оценивали с помощью Tajima D-теста и теста Fu.

В программе Network 4.5 реконструировалась медианная сеть по принципу минимального числа нуклеотидных различий. Филогенетическое дерево строилось методом «ближайшего соседа» с бутстреп тестом в 1000 репликаций в MEGA-6.

Программа BEAST была использована для реконструкции графика изменения эффективного размера популяции для проб из Азово-Черноморского бассейна. Было проведено 20 млн генераций с использованием модели GTR и строгих молекулярных часов, значение clock rate было взято 0,019. Визуализацию графика и оценку сводимости результатов – в программе Tracer v.1.6.

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. Оценка частот нуль-аллелей и поправки на них показателей разнообразия и индексов фиксации проведены в программе FreeNa. Для определения числа популяций в Азово-Черноморском бассейне, путей миграций и оценки смешанных скоплений использовалась программа Structure 2.3.4. 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). 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 $L(K)$ и с использованием h oc quantity (ΔK).

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., Oueslati et al., 2014; 2006; Silva et al., 2014). После объединения были получены данные для 36 различных географических точек.

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), различия значений климатических факторов на разных глубинах оценивались с помощью дисперсионного анализа Фридмана и коэффициента Кендала. Глубина выбиралась с учетом биологии вида. Гидрологические факторы брались в зависимости от месяца сбора проб в каждой точке. Зависимость частот клад от гидрологических факторов подтверждалась с помощью непараметрического ANOVA Крускала-Уоллиса (H-тест) и медианного теста, корреляционный анализ основывался на ранговом коэффициенте корреляции Спирмена. 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. В качестве зависимой переменной была оставлена только частота клады А. 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: $W=0,88$, $p=0,00015$). В ходе проведения анализа, было выявлено ограничение на использование параметрических моделей.

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. 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 (база 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.

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 и непараметрического дисперсионного анализа ANOVA. Симметричность нового морфологического параметра для левого и правого отолита оценивалась с помощью критерия Манна-Уитни. Анализ межгрупповой изменчивости морфологических признаков и расчет классифицирующих уравнений проводили методом дискриминантного анализа.

Тест на нормальность проводился с помощью критериев Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Внутривидовая структура европейского анчоуса в Азово-Черноморском регионе

3.1.1. Морфологические данные

В настоящее время основным морфологическим параметром для определения подвида *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus* является индекс отолитов, его значения соответственно равны 2,15 и 1,96. Проанализировано 346 отолитов у 183 особей европейского анчоуса (таблица 1, выборки 4-5) и показано, что морфологические характеристики отолита (длина и ширина) коррелируют со стандартной длиной рыбы ($R^2=0,855$). Рассчитана погрешность определения индекса отолитов: 0,08.

Для решения проблемы эффективной идентификации подвигов был разработан дополнительный морфологический критерий, основанный на форме отолита – угол между рострумом и антерострумом (Водясова и др., 2017). Анализ кривых распределения

однородных выборок черноморского и азовского анчоуса по двум морфологическим параметрам отолитов (индекс и угол) представлены на Рисунке 1.

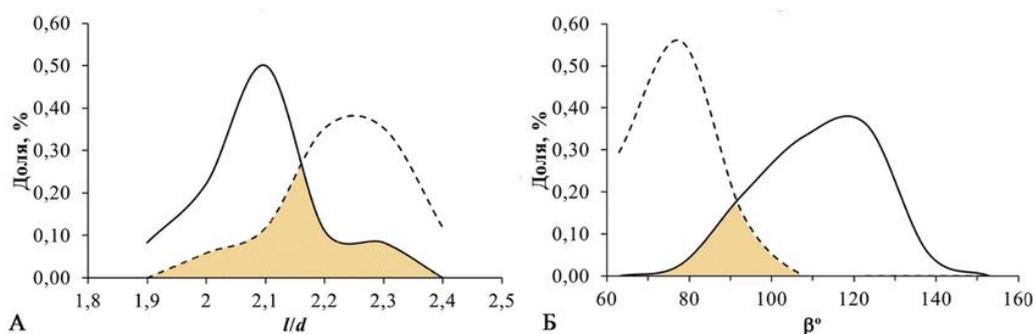


Рисунок 1 – Распределение значений морфологических параметров: индекса отолитов (А) и угла отолитов (Б) для азовской (сплошная линия) и черноморской (пунктирная линия) хамсы

В Таблице 2 представлены характерные для каждого подвида значения морфологических параметров отолитов.

Таблица 2 – Диапазоны значений индекса и угла отолита для подвигов *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus*

Подвид	Число особей	Форма отолита	Индекс отолита l/d		Угол отолита $\beta, ^\circ$	
			$\bar{x} \pm 2\sigma$	$\bar{x} \pm 3\sigma$	$\bar{x} \pm 2\sigma$	$\bar{x} \pm 3\sigma$
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

Были получены следующие классифицирующие уравнения для идентификации двух подвигов:

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

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

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

Для проверки правильности идентификации подвигов европейского анчоуса по полученным уравнениям, был проведен морфологический анализ четырех особей черноморского анчоуса *E. e. ponticus* из зоологической коллекции ЗИН РАН. Следует отметить, что хранение проб в формалине, пагубно влияет на отолиты анчоуса (Рисунок 2).

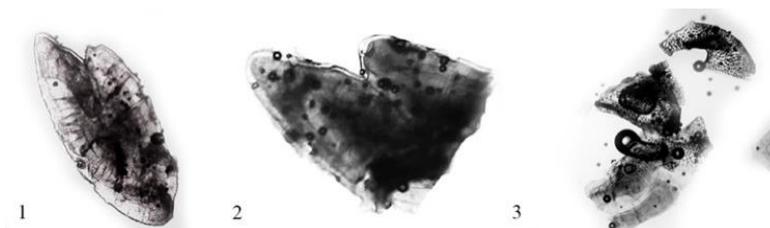


Рисунок 2 – Отолиты *E. e. ponticus* после хранения в формалине

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 2.1). У части особей отолиты развалились полностью (Рисунок 2.3), но некоторые остались пригодными для измерения угла отолита (Рисунок 2.2), что также позволяет сделать вывод о подвидовой принадлежности. Все значения параметров отолитов соответствуют полученным интервалам для черноморского подвида анчоуса.

На основе морфологических параметров отолита (l/d и β) 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 за 2010 – 2016 года (рисунок 3).

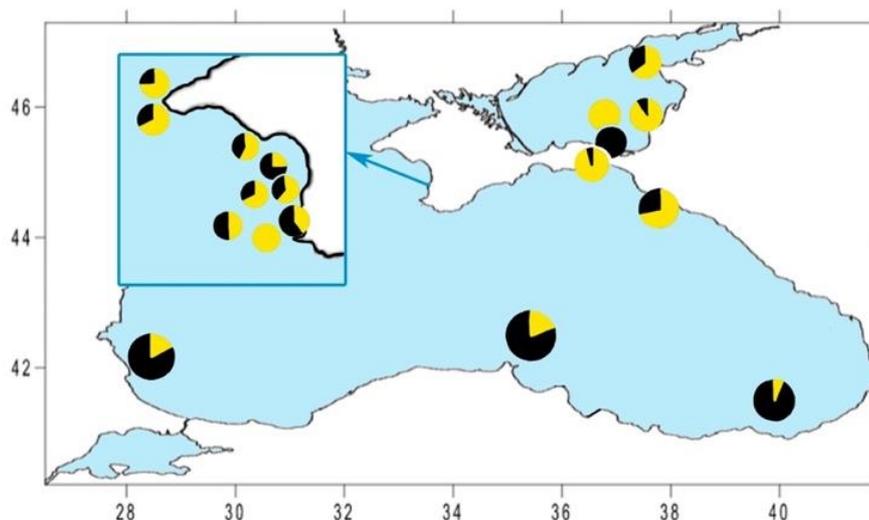


Рисунок 3 – Географическое распространение азовского (желтый цвет) и черноморского (черный цвет) подвидов европейского анчоуса

3.1.2. Генетические данные

Изученный фрагмент митохондриального гена *cytb* содержит 685 пн и соответствует положению 14463 – 15147 полного генома мтДНК европейского анчоуса (GenBank AP009137.1).

Таблица 3 – Основные характеристики изученных выборок

Выборка	N	Подвидовая структура, %		Номера в GenBank	Параметры генетической изменчивости						
		Азов.	Черн.		h	S	S _{inf}	Hd	Pi	D	F _s
мыс Тарханкут	18	61	39	KX620959- KX620969	11	21	11	0,941	0,005	-1,56	-3,51
Севастополь	13	46	54	KX620970- KX620976	10	14	5	0,962	0,004	-1,58	-5,48
Керченский пролив	14	100	0	KX620977- KX620985	12	21	4	0,978	0,006	-1,71*	-6,88*
Багуми	5	40	60	KX620990- KX620993	5	8	0	1,000	0,006	-1,17	-2,12
Трабзон	10	10	90	KX620994- KX620998	10	18	2	1,000	0,006	-1,67*	-6,79*
Синоп	9	11	89	KX620999- KX621002	8	12	2	0,972	0,005	-1,40	-4,22
Босфорск. пролив	15	20	80	KX620986- KX620989	12	17	7	0,971	0,005	-1,26	-6,55
Общее	84				44	55	23	0,962	0,005	-2,24**	-45,14**

Примечание: N – объем выборок, h – число гаплотипов, S – число полиморфных сайтов, S_{inf} – число информативных замен, Hd – гаплотипическое разнообразие, Pi – нуклеотидное разнообразие, D – значение Tajima D-теста на нейтральность, F_s – значение Fu-теста на нейтральность

Все рассматриваемые группы хамсы характеризуются высоким гаплотипическим и низким нуклеотидным разнообразием (Таблица 3), что свидетельствует об экспансивном росте численности популяций. Это подтверждается и отрицательными значениями тестов на нейтральность.

Величина критерия общей генетической дифференциации (индекс фиксации F_{st}) (Wright, 1951) мала и составила -0,00046. Полученные значения генетических дистанций (D_{xy} варьировало от 0,0044 до 0,0059) между различными географическими точками сбора также не выявили генетических отличий.

Согласно расчетам, начало роста азово-черноморской хамсы следует отсчитывать как 128321 поколений назад (что равно 128 тысяч лет назад). Проведена оценка изменения эффективной численности европейского анчоуса на основе данных по Азово-Черноморскому бассейну с использованием коалесцентного Баевского анализа (BSP-анализа), резкие изменения численности отсутствуют.

Построенная медианная сеть гаплотипов (Рисунок 4) не выявила генетических отличий по митохондриальному гену *cytb* ни для особей из различных районов, ни для различных подвидов.

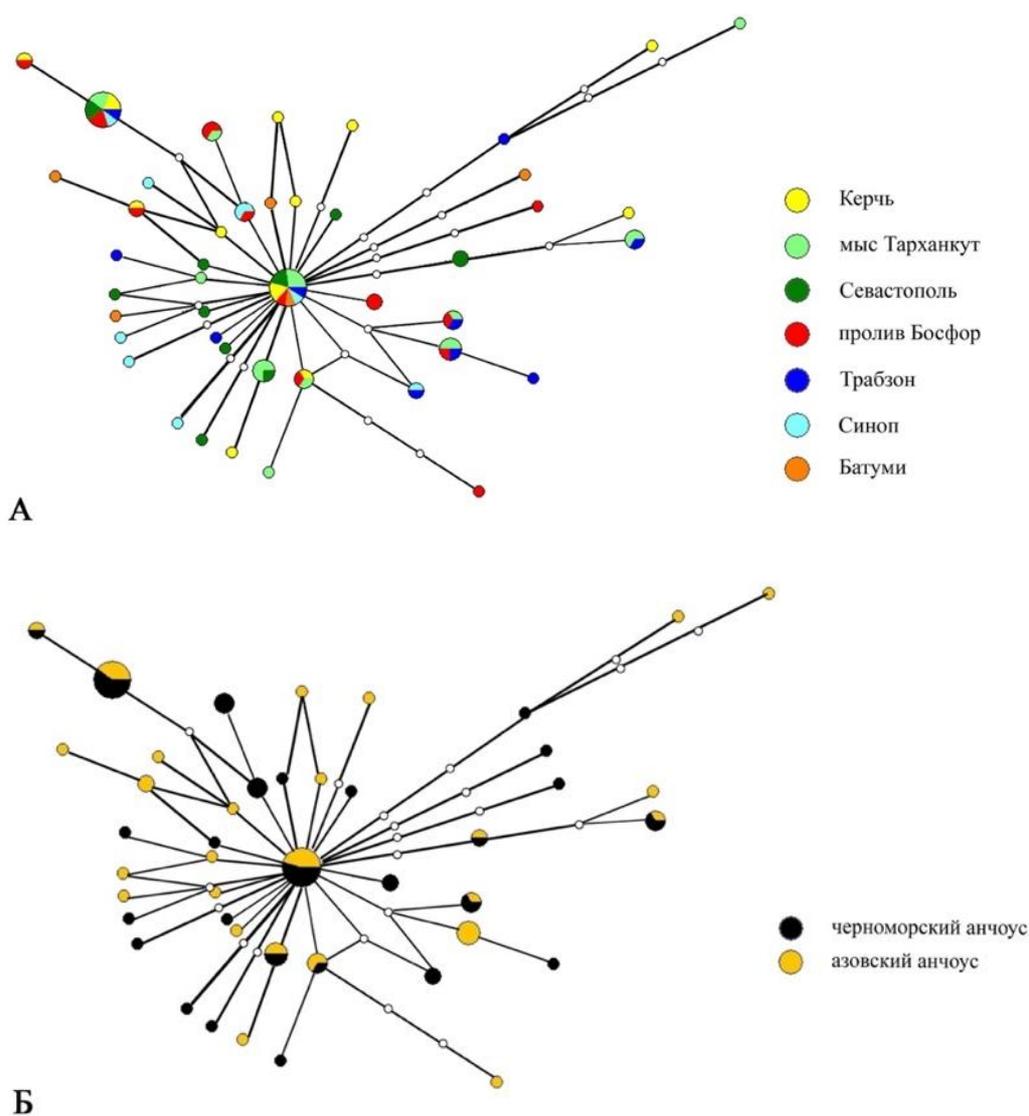


Рисунок 4 – Медианная сеть гаплотипов европейского анчоуса из Азовского и Черного морей. Гаплотипы раскрашены в зависимости от места сбора проб (А) и в зависимости от подвидовой принадлежности (Б). Не покрашенные круги указывают

промежуточные гаплотипы. Величина круга пропорциональна количеству идентичных гаплотипов, длина ветвей – количеству замен (между двумя соседними гаплотипами одна нуклеотидная замена).

Фрагментный анализ проводился у 288 особей анчоуса из 10 локалитетов по 10 микросателлитным локусам. В ходе анализа часть локусов была отброшена из-за плохой амплификации, а также были исключены особи, у которых не амплифицировалось более одного локуса или были проблемы с точным определением длин аллелей. Общая характеристика дана в Таблице 4.

Таблица 4 – 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
N	205	208	189	208	208	207	189
Na	5	15	11	10	18	19	9
Nap	3,700	9,900	5,700	6,400	8,100	7,500	6,300
Ne	2,400	6,423	3,711	4,501	5,038	3,780	4,826
I	1,014	2,000	1,416	1,607	1,744	1,530	1,656
Ho	0,563	0,729	0,518	0,807	0,689	0,371	0,434
He	0,569	0,837	0,712	0,771	0,795	0,708	0,786
Nm	10,606	5,037	2,460	5,184	3,699	3,626	4,545
F	0,004	0,124	0,296	-0,046	0,136	0,444	0,439
F_{IS}	0,011	0,128	0,272	-0,047	0,134	0,475	0,448
F_{IT}	0,034	0,169	0,339	0,002	0,189	0,509	0,477
F_{ST}	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, Na – число аллелей на локус, Nap – среднее число аллелей на локус, Ne – среднее эффективное число аллелей, I – среднее значение индекса Шеннона, Ho – средняя наблюдаемая гетерозиготность, He – средняя ожидаемая гетерозиготность, F – среднее значение индекса фиксации, F_{IS}, F_{IT}, F_{ST} – значения F-статистики Райта, N_m – поток мигрантов.

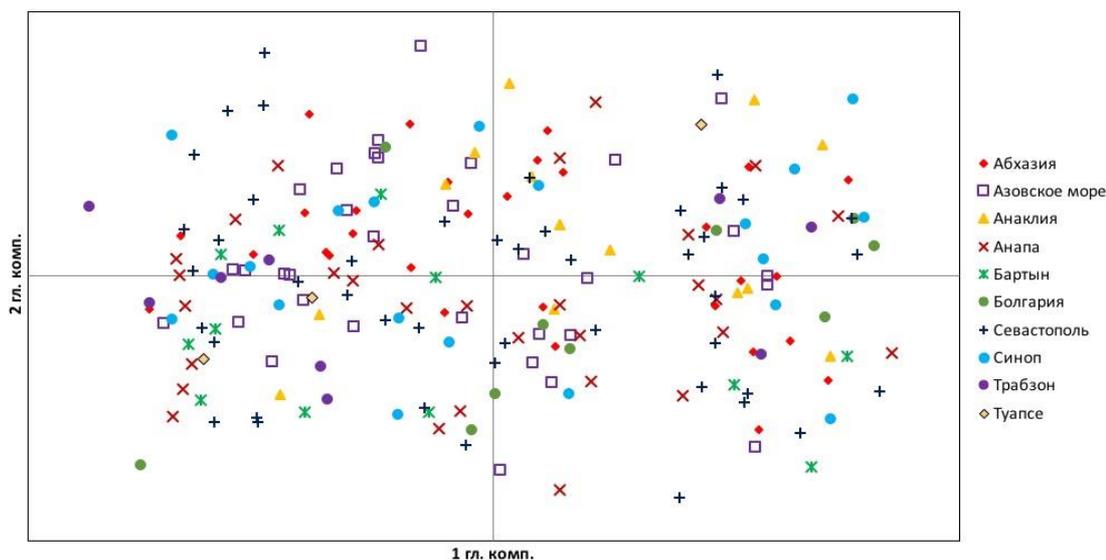


Рисунок 5 – Анализ главных компонент для всех географических точек по 7 микросателлитным локусам.

Значения F_{ST} колеблется от 0,023 до 0,092, что согласно Райту, соответствует слабой генетической дифференциации. Значения параметров генетической дифференциации, рассчитанные по данным изменчивости микросателлитных локусов, между географическими точками сбора проб, а также анализ методом главных компонент не выявил существенных различий (Рисунок 5).

На основе морфологического анализа, было сформировано две совокупности, общим объемом проб 138. Для фрагментного анализа было отобрано 8 микросателлитных локусов. Графики распределения частот аллелей по восьми локусам демонстрируют отсутствие различий (Рисунок 6).

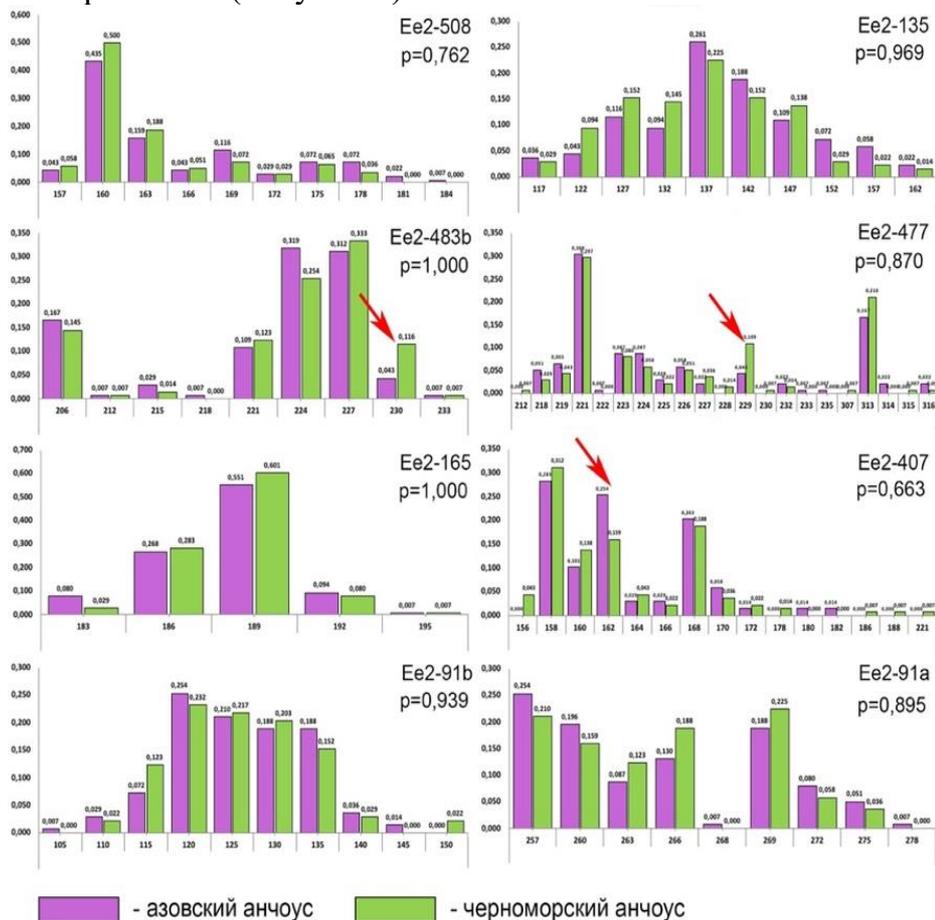


Рисунок 6 – Распределение частот аллелей для восьми микросателлитных локусов у двух подвидов европейского анчоуса в Азово-Черноморском регионе. Красные стрелки указывают те аллели, по частотам которых отличаются азовский и черноморский анчоус.

Наблюдаемые видимые различия по частотам у трех аллелей (указаны стрелками) не являются значимыми для генетической дифференциации двух подвидов. Для всех локусов различия между азовским и черноморским анчоусом недостоверны, о чем свидетельствуют значения p , рассчитанные с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Крайне низкое значение индекса фиксации Райта F_{ST} и кластерный анализ в *Structure* демонстрируют отсутствие генетической дифференциации двух подвидов *E. encrasicolus* в Черном и Азовском морях (Рисунок 7). В тоже время на основе отолитов эти две совокупности достоверно различаются (Рисунок 8).

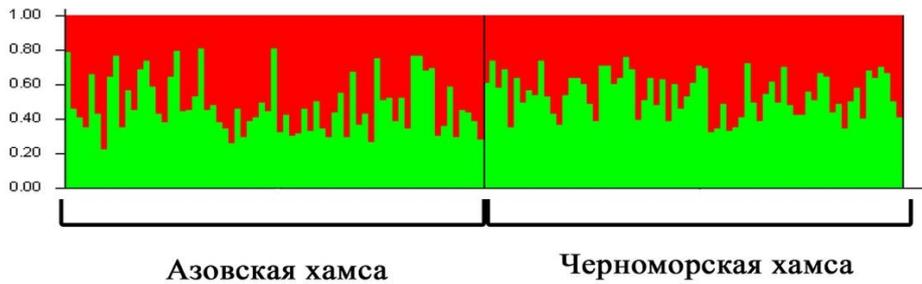


Рисунок 7 – Результаты кластеризации Structure для K=2 (Admixture Model with LockPrior) у 138 особей по 8 микросателлитным локусам

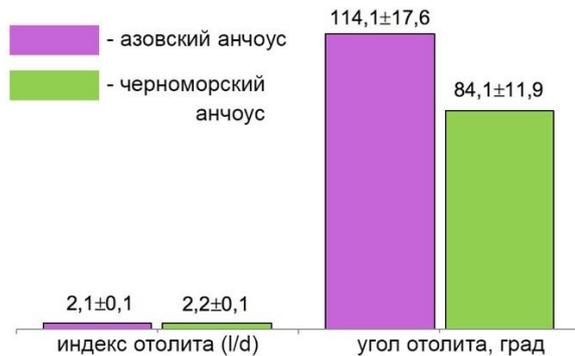


Рисунок 8 – Средние значения морфологических характеристик отолидов для азовского и черноморского анчоуса

3.1.3. Анализ причин несоответствия генетической и морфологической изменчивости

Мы предполагаем, что одной из причин, приводящей к несовпадению по генетическим и морфологическим маркерам, являются различия в местах нереста и нагула. Различные гидрохимические и гидрологические характеристики, кормовая база могут оказывать влияние на темп роста или морфометрические характеристики.

3.2. Изменчивость митохондриальной ДНК на протяжении всего ареала европейского анчоуса

3.2.1. Распределение двух митохондриальных линий европейского анчоуса

На основе собственных данных и из литературы был проведен анализ встречаемости гаплотипов, характерных для двух клад А и В (Рисунок 9).

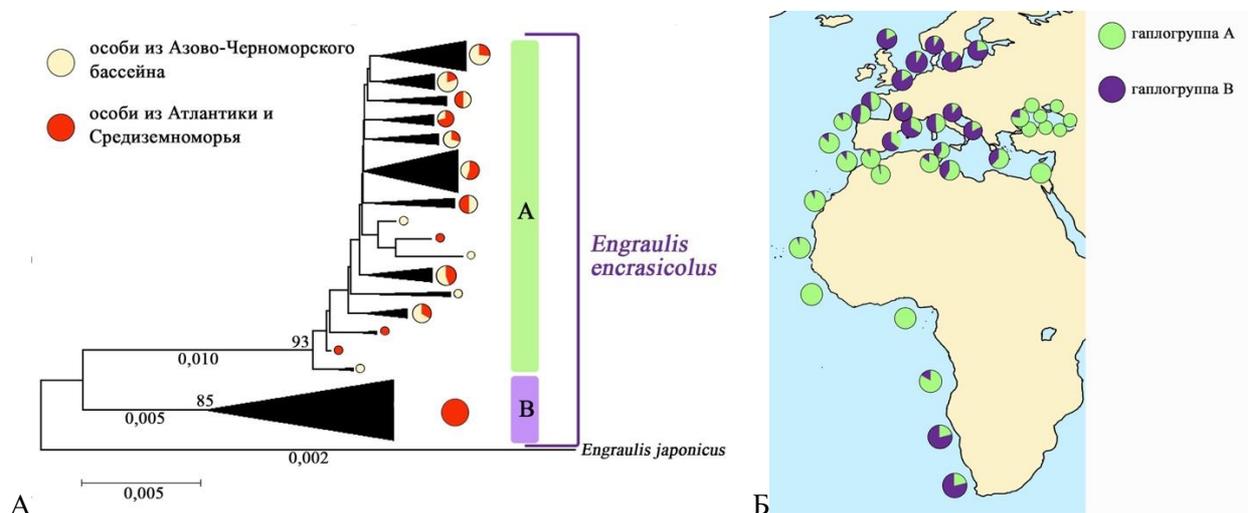


Рисунок 9 – А – Филогенетическое дерево на основе изменчивости *cytb*. Построение проводилось методом «ближайшего соседа» (NJ) с бутстреп тестом в 1000 репликаций. Величина треугольников пропорциональна числу особей. Круги демонстрируют соотношение особей из Азово-Черноморского бассейна (желтый цвет) и из Атлантики и Средиземноморья (красный цвет). Цифры у узлов – бутстреп поддержка. Длины ветвей в соответствии с масштабом. Б – Распределение частот гаплотипов, характерных для двух митохондриальных линий А и В

Проведенный филогенетический анализ подтвердил наличие двух митохондриальных линий европейского анчоуса с уровнем дивергенции 1,5 %.

3.2.2. Связь филогеографической структуры с гидрологическим режимом

Определена зависимость частоты встречаемости гаплотипов характерных для двух митохондриальных линий и различных гидрологических параметров. Выявлено два основных гидрологических параметра (температура и соленость), которые наиболее вероятно оказывают влияние на распределение двух митохондриальных линий по всему ареалу (для температуры и солености: $p < 0,01$).

3.2.3. Моделирование экологических ниш и географическое распространение европейского анчоуса

Полученные графики кривых отклика демонстрируют различные диапазоны значений температуры и солености для предсказанной пригодности местообитания с учетом всех скоплений (Рисунок 10). 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 (Рисунок 11).

Получены карты, демонстрирующие промоделированные экологические ниши для двух митохондриальных линий с расчетной вероятностью подходящих условий на всем ареале (Рисунок 12), на основе палеоклиматических данных 6 и 21 тысячу лет назад (Рисунок 13).

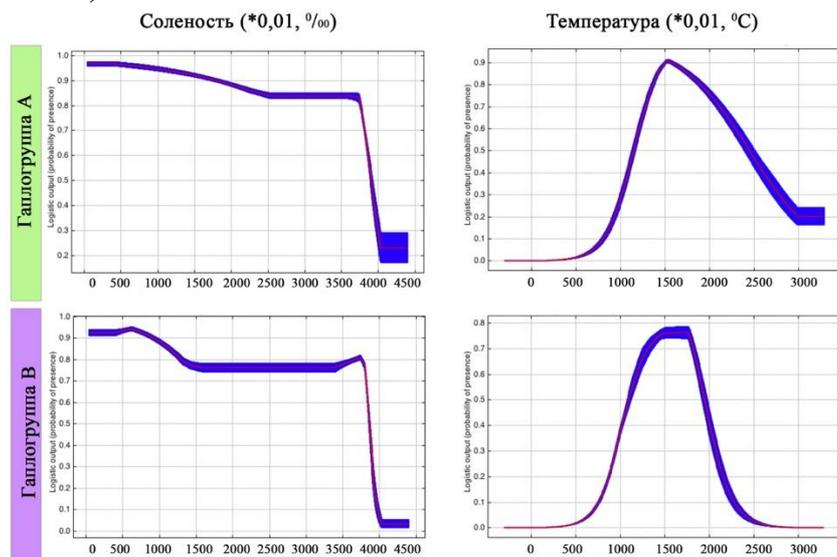


Рисунок 10 – Кривые отклика для солености и температуры для двух гаплогрупп А и В с учетом всех скоплений

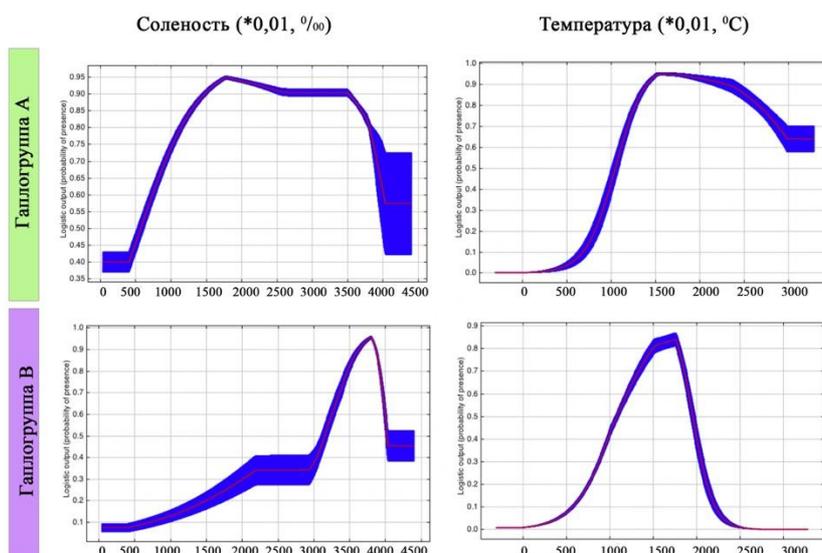


Рисунок 11 – Кривые отклика для солености и температуры для двух гаплогрупп А и В с учетом только нерестовых скоплений

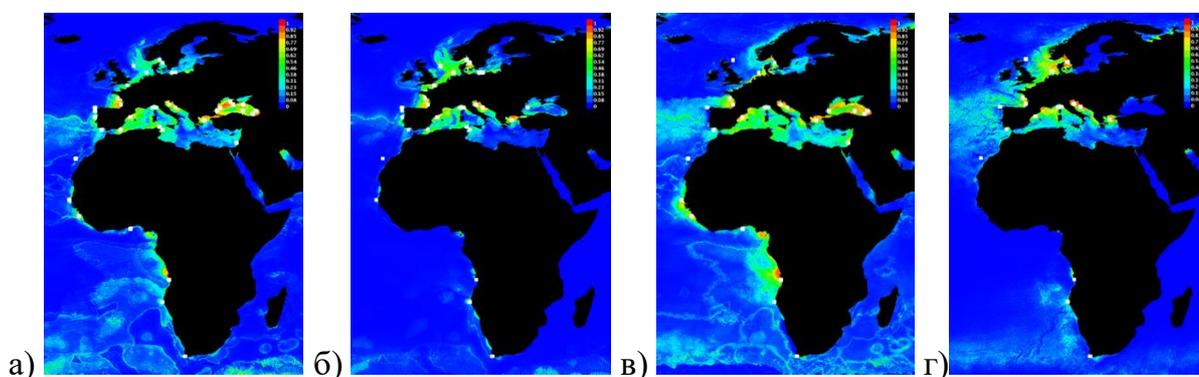


Рисунок 12 – Моделирование в Maxent экологических ниш для клады А: все скопления (а) и нерестовые (в) и клады В: все скопления (б) и нерестовые (г). Цветная шкала показывает степень комфортности условий для обитания вида от неприемлемых (синий цвет) до наиболее комфортных (красный цвет).

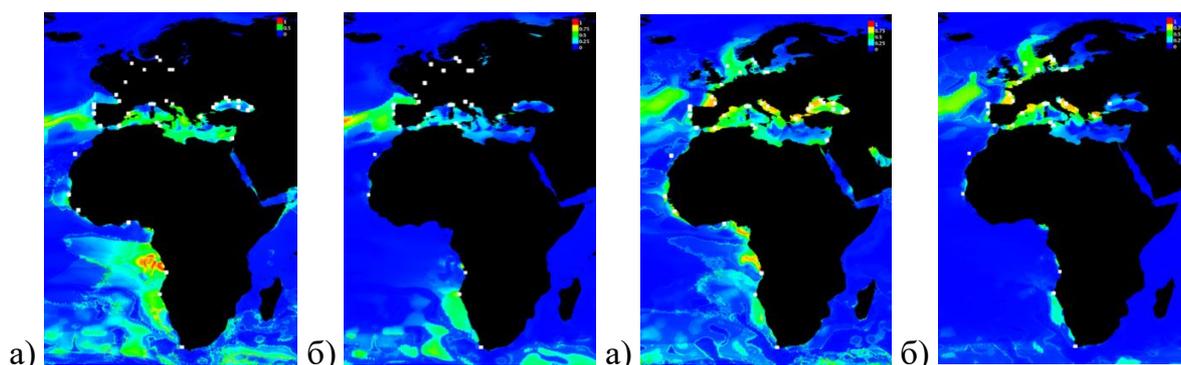


Рисунок 13 – Моделирование в Maxent экологических ниш для клад А (а) и В (б) 21 тысячу лет назад; для клад А (в) и В (г) 6 тысяч лет назад

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

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

Была исследована внутривидовая структуру европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне с помощью мтДНК и микросателлитных локусов.

Предполагалось, что в Азово-Черноморском регионе будет показана генетическая дифференциация между стадами анчоуса, которые нерестятся в различных районах этих морей. Такие данные могли бы подтвердить обоснованность выделения подвидов на основе морфологических отличий.

Был использован общепринятый критерий идентификации подвидов (индекса отолитов) и новый, разработанный нами, дополнительный критерий (угла отолитов) для получения соотношения азовского и черноморского анчоуса в каждой точке (Таблица 3). 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. Тем не менее большинство скоплений является смешанным, что показано на Рисунке 3.

Результаты по молекулярным маркерам показали отсутствие генетической дифференциации во всем Азово-Черноморском бассейне. Отсутствие дивергенции между группами анчоуса демонстрируют крайне низкие значения генетических расстояний. Медианная сеть, раскрашенная в зависимости от подвидовой принадлежности каждого гаплотипа, также демонстрирует одинаковую частоту встречаемости не уникальных гаплотипов у *E. e. ponticus* и *E. e. maeoticus* (Рисунок 4). Наличие одинаковых гаплотипов в различных точках бассейна указывает на высокий уровень миграций. Таким образом, нет подтверждения какой-либо географической изоляции на основе изменчивости митохондриального гена цитохрома *b*.

Анализ по 8 микросателлитным локусам также показал отсутствие генетически отличающихся совокупностей анчоуса в Азово-Черноморском бассейне. Различающиеся по морфологии отолитов две группы хамсы (Рисунок 8) не имеют различий по генетическим характеристикам (Рисунок 6, 7). Как и для *cutb*, так и для микросателлитных локусов, мы не выявили различий не только между азовским и черноморским анчоусом, но и между различными географическими районами (Рисунок 5).

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. Мы же наблюдаем абсолютное несовпадение дифференциации двух подвидов европейского анчоуса в Азово-Черноморском бассейне по морфологическим и генетическим характеристикам. 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 настоящее время для подтверждения валидности статуса подвида морфологических параметров недостаточно (Алтухов, 1997). Необходимо подтвердить дифференциацию подвидов на основе генетических критериев (Ворошилова, 2016 и др.).

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. Это 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. В результате 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, отсутствию генетической дифференциации.

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. 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 (Vignon, 2012 и др.).

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 ‰, солоноводная – 17-20 ‰ (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 и др.). Известно, что азовская хамса нагуливает больший процент жира чем черноморская (Shulman, 2002). Различаются данные подвиды и по скорости роста, и некоторым меристическим признакам. Многие исследования показали, что меристические признаки определяются местом, где растет молодь до определенного критического возраста и фенотипы определяются окружающей средой (Kinsey et al., 1994 и др.).

Подобная морфологическая изменчивость наблюдается у генетически гомогенных популяций анчоуса в Средиземноморском бассейне (Jemaа et al., 2015 и др.). Следует отметить, что для вида *Sardina pilchardus* наблюдается такая же дифференциация популяций из южных и северных районов Средиземноморья, как и для *E. encrasicolus* (Jemaа 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 невозможно с использованием молекулярно-генетических маркеров (Begg, Brown, 2000 и др.).

Таким образом, различие внешних экологических факторов в районах, характерных для азовской и черноморской хамсы, наиболее вероятно приводит к появлению морфологических отличий на первом году жизни. В данном контексте, фенотипическая изменчивость у двух подвидов является 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 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 (Dobrovolov, 1992 и др.). 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 et al., 1996) появилась возможность провести анализ распространения хамсы по ареалу.

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 свидетельствует о том, что для популяции анчоуса в Азово-Черноморском регионе не наблюдался экспансивный рост или резкое снижение эффективного размера популяции.

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 (Dobrovolov, 1992)). Низкое значение индекса фиксации и крайне низкие значения генетических дистанций (Таблица 3, 4) говорят об отсутствии дивергенции между различными популяциями европейского анчоуса в Азово-Черноморском регионе. Наши результаты позволяют сделать вывод, что анчоус проник во время последнего открытия Босфора около 10 тысяч лет назад. 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.

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). 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).

Подходы, применяемые в филогеографии, позволяют не только выявить закономерности расселения и дать демографическую оценку состоянию популяции, а также 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.

Все работы, демонстрируют слабую генетическую гетерогенность европейского анчоуса по митохондриальным маркерам (Castilho, Silva, 2016 и др.). Построенное нами филогенетическое дерево выявляет только две клады с высокой бутстреп поддержкой, а также отсутствие дифференциации не только между Азовским и Черным морями, но и между этим регионом и Средиземноморским и Атлантическим бассейнами (Рисунок 9). Такое отсутствие генетической дифференциации между анчоусами из разных бассейнов отмечалось не единожды (Oueslati et al., 2014 и др.).

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 (Silva et al., 2014 и др.). 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 достаточно для накопления замен и, тем не менее, дифференциация по *cytb* внутри клад А (как и внутри клад В) не возникла и на всем ареале наблюдается генетическая однородность по данному маркеру внутри двух филогенетических линий.

Другое объяснение заключается в существовании постоянного потока 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 (Silva et al., 2014). Кроме того, неоднократно упоминалось о способности анчоуса преодолевать проливы, которые соединяют бассейны (Demir, 1974 и др.).

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. Пересекающиеся ареалы подтверждают высказанное предположение о вторичном контакте этих двух клад. 6 тысяч лет назад происходит расширение ареала вида на север Атлантического океана, что связано с потеплением после последнего ледникового периода (Рисунок 13). Вероятно, в этот период происходит активная миграция, которая приводит к исчезновению дифференциации и перемешиванию 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.

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 9). 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 двух митохондриальных линий на ареале.

В Атлантическом океане в пробах анчоуса, собранных ближе к экватору, преобладает клада А, с удалением от экватора к северу и югу начинает преобладать клада В (Рисунок 9). Следует отметить, что в Бискайском заливе представлены обе клады с почти одинаковым соотношением: 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 клады В, на юге – из клады А. 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.

Выдвигались две гипотезы, почему клада В практически не представлена в Черном море: отрицательный отбор или отсутствие потока генов. Авторами 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 распространиться 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 и др.). 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). На основе данных белкового полиморфизма показано существование возможных гибридов черноморского и средиземноморского анчоуса (Калнин, Калнина, 1985). 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 (Quintela et al., 2014 и др.). Однако, говорить о возможной экологической адаптации можно, если существуют несинонимические мутации в анализируемом белок-кодирующем фрагменте. У европейского анчоуса была ранее 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, говорит о возможном существовании факторов, влияющих на наблюдаемое распределение частот встречаемости клад А и В.

Было показано, что температура играет определяющую роль в формировании мозаичной структуры распределения гаплотипов (Silva et al., 2014). Наши результаты показали, что температура остается фактором, влияющим на распределение гаплогрупп. По всей видимости, она оказывает влияние в случае, когда анчоус имеет возможность свободно мигрировать из регионов с неблагоприятными условиями. Свободное

перемещение анчоуса по Атлантическому и Средиземноморскому бассейнам приводит к формированию наблюдаемой мозаичной структуры распределения клад.

Другим гидрологическим фактором, отличающим Азово-Черноморский бассейн, является соленость. Проведенный ANOVA Крускала-Уоллиса показал достоверную зависимость распределения частот гаплотипов клад от солености. 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. 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 10, 11) 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. Наличие клады В в точках из Балтийского моря с крайне низкой соленостью 7 – 8 ‰ объясняется тем, что это зимовальные скопления.

На Рисунке 12 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 14. Гипотеза отрицательного отбора под действием низких значений солености на икру может объяснить отсутствие представителей клады В по всему Азово-Черноморскому бассейну.

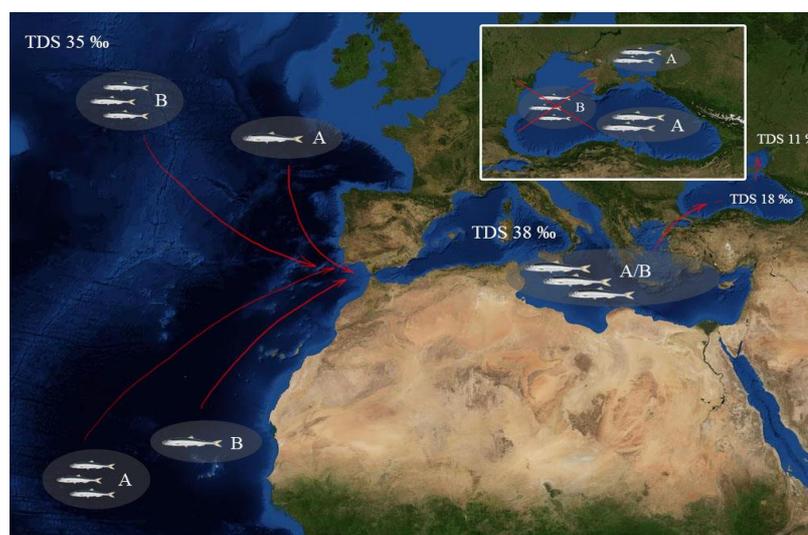


Рисунок 14 – Предполагаемая модель распространения двух митохондриальных линий под действием гидрологических факторов

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 et al., 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. maeoticus*) 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 показано, что европейский анчоус возможно 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 новозвксинский 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК

1. Небесихина Н.А., Барминцева А.Е., Тимошкина Н.Н., Водясова Е.А. Микросателлитная изменчивость европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* Linnaeus, 1758 // Водные биоресурсы и среда обитания. 2019. Т. 2, № 4. С. 73-84.
2. Vodiasova E. A., Abramson N. I. Genetic Variability of Anchovy in the Azov-Black Sea Basin // Russian Journal of Genetics. 2017. Vol. 53, iss. 6. P. 680-687. <https://doi.org/10.1134/S1022795417060138>
(Водясова Е.А., Абрамсон Н.И. Генетическая изменчивость анчоуса в Азово-Черноморском бассейне // Генетика. 2017. Т. 53, № 6. С. 696–704. <https://doi.org/10.7868/S0016675817060133>)
3. Vodiasova E. A., Soldatov A. A. Identification of Subspecies of European Anchovy *Engraulis Encrasicolus* (Engraulidae) in the Wintering Aggregations Based on Morphological Parameters of Otoliths // Journal of Ichthyology. 2017. Vol. 57, iss. 4. P. 553–559. <https://doi.org/10.1134/S0032945217040191>

(Водясова Е. А., Солдатов А. А. Идентификация подвидов европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* (Engraulidae) в зимовальных скоплениях на основе морфологических параметров отолита // Вопросы ихтиологии. 2017. Т. 57, № 4. С. 408-414. <https://doi.org/10.7868/S0042875217040233>)

4. Водясова Е. А. Значения индекса отолитов у разноразмерных групп анчоуса *Engraulis encrasicolus* у берегов Крыма // Доповіді Національної академії наук України. 2013. № 2. С. 133-137.

5. Водясова Е. А. Новый морфологический критерий для анализа неоднородных скоплений хамсы // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія. 2013. Вип. 3 (56). С. 38-42.

6. Водясова Е. А. Оценка величины погрешности при расчете индекса сагиттальных отолитов *Engraulis encrasicolus* // Біологічні системи. 2012. Т.4, вип. 4. С. 494-497.

Статьи в других периодических изданиях и сборниках конференций

1. Седельникова Е. А., Чащин А. К. Анализ генетической изменчивости европейского анчоуса в азово-черноморском регионе методом RAPD-PCR (предварительные результаты) // Водные биоресурсы и аквакультура: современное состояние и перспективы научного обеспечения : [материалы конф.], Киев, 12-14 октября 2010 г. Киев, 2010. С. 254-257.

2. Седельникова Е. А. Некоторые особенности использования индекса отолитов анчоуса при определении популяционной принадлежности // Современные проблемы эволюционной морфологии животных : материалы II Всерос. конф. с междунар. участием к 105-летию со дня рожд. акад. А. В. Иванова, 20-22 октября 2011 г. Санкт-Петербург. Санкт-Петербург: ЗИН РАН, 2011. С. 310-314.

3. Водясова Е. А. Погрешность расчета индекса сагиттальных отолитов анчоуса // Современные проблемы теоретической и практической ихтиологии: тез. докл. V Междунар. ихтиол. науч.-практ. конф., Черновцы, 13-16 сентября 2012 г. Черновцы, 2012. С. 49-51.

4. Водясова Е. А., Куликова А. Д. Особенности использования RAPD в популяционных исследованиях // Актуальные вопросы биологической физики и химии: тез. докл. VIII Междунар. науч.-техн. конф., Севастополь, 23-27 апреля 2012 г. Севастополь, 2012. С. 80-82.

5. Водясова Е. А. Использование нового морфологического критерия при анализе хамсы, выловленной у берегов Крыма // Современные проблемы физики, химии и биологии : материалы I Междунар. науч.-техн. конф., Севастополь, 28-30 ноября 2012 г. Севастополь, 2012. С. 154-156.

6. Водясова Е. А. Морфологические и молекулярно-генетические отличительные критерии популяций *Engraulis encrasicolus* в азово-черноморском бассейне // «Понт Эвксинский-2013» : материалы VIII Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых, Севастополь, Украина, 01-04 октября 2013. Севастополь : «DigitPrint», 2013. С. 29-30.

7. Водясова Е. А. Новый морфологический критерий для анализа неоднородных скоплений хамсы, выловленной у берегов Крыма // Современные проблемы теоретической и практической ихтиологии : материалы V Междунар. ихтиол. науч.-практ. конф., Тернополь, Украина 9-11 октября 2013. Тернополь, 2013. С. 53-56.

8. Водясова Е. А. RAPD анализ полиморфизма популяций европейского анчоуса в Азово-черноморском регионе (предварительные результаты) // Актуальные

вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2013 : материалы IX Междунар. науч.-техн. конф., Севастополь, Украина, 22-26 апреля 2013. Севастополь, 2013. С. 15.

9. Водясова Е. А. Изучение популяционной структуры смешанных скоплений анчоуса (*Engraulis encrasicolus*) у берегов Крыма // Популяционная экология растений и животных: материалы I Междунар. молодежной науч. конф., Уфа, Россия, 27 апреля 2015. Уфа, 2015. С. 28–34.

10. Водясова Е. А. Применение дискриминантных классифицирующих уравнений для определения черноморского и азовского подвидов европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* // «Pontus Euxinus — 2015»: тез. IX Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых (с междунар. участием) по проблемам водных экосистем, посвящ. 100-летию со дня рожд. д.б.н., проф., чл.-кор. АН УССР В. Н. Грезе, 17-20 ноября 2015 г. Севастополь: DigitPrint, 2015. С. 36–38.

11. Водясова Е. А., Абрамсон Н. И. Морфологическая и генетическая изменчивость европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* в азово-черноморском бассейне // Современные проблемы эволюционной морфологии животных : материалы III Всерос. конф. с Междунар. участием к 110-летию со дня рожд. акад. А. В. Иванова, 26-28 сентября 2016 г. Санкт-Петербург. Санкт-Петербург: ЗИН РАН, 2016 г. С. 27-28.

12. Водясова Е. А., Абрамсон Н. И. Филогеография европейского анчоуса *Engraulis encrasicolus* // Морские биологические исследования: достижения и перспективы : в 3-х т. : сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. с Междунар. участием, приуроч. к 145-летию Севастопольской биологической станции, Севастополь, 19-24 сентября 2016 г. Севастополь: ЭкоСи-Гидрофизика, 2016. Т. 1. С. 381-384.

13. небесихина Н. А., Водясова Е. А., Лепешков А. Г., Иванова Е. А., Барминцева А. Е. Структура нерестовых скоплений европейского анчоуса *E. encrasicolus* на основании морфологии отолитов и микросателлитного анализа // Наземные и морские экосистемы Причерноморья и их охрана : сб. тез. науч.-практ. шк.-конф., Новороссийск, Краснодарский край, Россия, 23–27 апреля 2018 г. Севастополь : ФГБНУ «Институт природно-технических систем», 2018. С. 110-111.