

УДК 597.541.575.113.12

## ПРОБЛЕМЫ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ ПУЗАНКОВЫХ СЕЛЬДЕЙ РОДА *ALOSA* (ALOSIDAE) ПОНТО-КАСПИЙСКОГО БАССЕЙНА

© 2024 г. С. Ю. Орлова<sup>1,2</sup>, О. Р. Емельянова<sup>1,3</sup>, Н. А. Небесихина<sup>4</sup>,  
Н. И. Рабазанов<sup>5,6</sup>, А. М. Орлов<sup>2, 5, 6, 7, 8, \*</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства  
и океанографии – ВНИРО, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт океанологии РАН – ИО РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет, Москва, Россия

<sup>4</sup>Азово-Черноморский филиал Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства  
и океанографии – АзНИИРХ, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>5</sup>Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

<sup>6</sup>Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского федерального  
исследовательского центра РАН – ПИБР ДФИЦ РАН, Махачкала, Россия

<sup>7</sup>Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>8</sup>Институт проблем экологии и эволюции РАН – ИПЭЭ РАН, Москва, Россия

\*E-mail: orlov.am@ocean.ru

Поступила в редакцию 21.07.2023 г.

После доработки 24.08.2023 г.

Принята к публикации 28.08.2023 г.

Многочисленные исследования показывают, что видовая идентификация представителей рода *Alosa* с применением различных генетических маркеров зачастую проблематична и требуется поиск более специфических биомаркеров. Впервые проведён анализ полиморфизма фрагмента гена *COI* митохондриальной ДНК двух представителей указанного рода (*A. tanaica*, *A. kessleri*), дополненный новыми данными по *A. immaculata*, из вод Понто-Каспийского бассейна в сравнительном аспекте с другими представителями сельдевидных (*Clupeoidea*) родов *Alosa*, *Clupea*, *Clupeonella*, *Sprattus* и *Sardinops*. Главным результатом стало заключение, что внутри рода *Alosa* идентифицировать виды с помощью использованного маркера не представляется возможным. С одной стороны, образцы, отобранные от морфологически различающихся особей и идентифицированные как разные виды, имеют одинаковые гаплотипы. С другой – образцы, относящиеся к разным видам, различаются между собой на незначительное число нуклеотидных замен и не формируют самостоятельных клад на филограмме и гаплотипической сети. Это свидетельствует об отсутствии между исследованными образцами сельдей рода *Alosa* генетической дифференциации на отдельные виды и группы видов при использовании ДНК-штрихкодирования на основе гена *COI*. Причины подобного феномена могут быть следующие: 1) некорректная идентификация видов в уловах, поскольку пузанковые сельди (*Alosidae*) обладают высокой морфологической пластичностью и у многих видов основные внешние морфологические признаки зачастую перекрываются; 2) недавнее по меркам биологической эволюции время видообразования пузанковых сельдей рода *Alosa*; 3) различная доля межвидовых гибридов, которая в разных популяциях одного и того же вида может значительно варьировать.

**Ключевые слова:** *Alosidae*, генетическая дифференциация, гаплотип, межвидовая гибридизация, ген *COI* митохондриальной ДНК, Азовское море, Чёрное море, Каспийское море.

**DOI:** 10.31857/S0042875224030101 **EDN:** FNFKWN

Шеды, или пузанковые сельди (*Alosidae*), в составе отряда сельдеобразных (*Clupeiformes*) являются довольно древними представителями костистых рыб, известными по палеонтологическим находкам от 74 млн лет назад (меловой период) до интервала между нижним

четвертичным периодом и нижним эоценом (Gaudant, 1991; Taverne, 2004). В настоящее время семейство представлено четырьмя родами и 32–34 видами (Fricke et al., 2023; Froese, Pauly, 2023). Максимальным видовым богатством в семействе характеризуется род *Alosa*, который

насчитывает 15–24 видов морских, анадромных и пресноводных сельдей с нативными ареалами в водах Северной Америки, Северо-Восточной Атлантики, Средиземного моря, а также в Понто-Каспийском бассейне (Whitehead, 1985; Chiesa et al., 2014; Nelson et al., 2016; Fricke et al., 2023; Froese, Pauly, 2023). В водах России встречаются от 11 до 14 видов рода *Alosa* (Богуцкая, Насека, 2004; Dyldin et al., 2022), а наибольшее видовое разнообразие этого рода характерно для Понто-Каспийского бассейна (Faria et al., 2012), в котором, по данным разных авторов, насчитывается 7–17 видов и подвидов (Богуцкая, Насека, 2004; Esmacili et al., 2014; Lavoué et al., 2014; Зубкова, Разинков, 2022; Dyldin et al., 2022; Froese, Pauly, 2023).

Шеды являются стайными пелагическими рыбами, имеющими в различных районах Северного полушария важное промысловое значение (McBride, 2014; Giantsis et al., 2015; Кукуев, Орлов, 2018; Vernygora et al., 2018). Продукция из них высоко ценится на рынках, на которых пузанковых сельдей реализуют в замороженном и солёном виде, также их используют для производства консервов, пресервов и рыбной муки (Giantsis et al., 2015; Coad, 2017). Особую значимость имеют пузанковые сельди в Каспийском море (Jafari et al., 2014, 2019), где их промысел ведут уже более столетия (Малкин, Андрианова, 2008), а максимальный исторический вылов в начале XX в. превышал 350 тыс. т (Зубкова, Разинков, 2022). Тем не менее в настоящее время каспийские сельди являются одним из недоиспользуемых ресурсов рыболовства, общий допустимый улов которых в последние годы реализуется только на 8–9% (Зубкова, Разинков, 2022). Вместе с тем популяции некоторых видов шедов подвержены серьёзному негативному антропогенному воздействию в результате перелова, зарегулирования стока рек, загрязнения и разрушения местообитаний (Jafari et al., 2014; Taillebois et al., 2020), что привело к значительному сокращению их численности и стало причиной внесения отдельных видов в Красный список МСОП (Международный союз охраны природы – IUCN) как уязвимых (Dobrovolov et al., 2012; Dyldin et al., 2022).

Несмотря на промысловую значимость пузанковых сельдей и длительный период изучения, их таксономия остаётся до сих пор слабо разработанной, а филогенетические связи неясными, что препятствует разработке адекватных мер по их охране и требует проведения таксономической ревизии (Faria et al., 2004; Li, Ortí, 2007;

Esmacili et al., 2014; Lavoué et al., 2014; Vernygora et al., 2018).

В последние годы в мире широкое распространение в работах по систематике получил так называемый метод интегративной таксономии (Dayrat, 2005; Schlick-Steiner et al., 2010; Pante et al., 2015), основанный на использовании традиционного морфологического анализа и молекулярно-генетических подходов. Между тем систематика шедов, традиционно основанная на использовании морфологических признаков (число тычинок на первой жаберной дуге и пропорции тела), плохо применима на практике (Mezhzherin et al., 2009; Dobrovolov et al., 2012; Vernygora et al., 2018), что обусловлено широкой экологической пластичностью и высокой скоростью морфологической эволюции представителей рассматриваемой группы (Гаджикурбанов и др., 2012; Сулейманов, 2017). Зачастую всё это приводит к неверной идентификации видов и препятствует принятию адекватных решений по их охране и управлению запасами (Faria et al., 2004; Mezhzherin et al., 2009; Dobrovolov et al., 2012; Esmacili et al., 2014; Lavoué et al., 2014; Vernygora et al., 2018).

Молекулярно-генетических исследований, направленных на изучение таксономического положения, анализа популяционной структуры и филогенетических связей представителей рода *Alosa* с использованием различных маркеров (аллозимы, микросателлиты, митохондриальные гены) на сегодняшний день проведено немало. Большая их часть выполнена в отношении европейских видов – преимущественно *A. alosa* и *A. fallax* (Boisneau et al., 1992; Alexandrino et al., 2006; Faria et al., 2011, 2012; Chiesa et al., 2014; Giantsis et al., 2015; Sabatino et al., 2022). В меньшей степени генетически изучены североамериканские виды (Julian, Bartron, 2007; Bowen et al., 2008; Mickle et al., 2015; Wang et al., 2017; Plough et al., 2018; Ogburn et al., 2023). Не остались в стороне от генетических исследований и виды пузанковых сельдей Понто-Каспийского бассейна. Однако до сих пор материалы ограничены локальными сборами отдельных видов из вод Азербайджана (Сулейманов, 2017), Болгарии (Dobrovolov et al., 2012), Ирана (Bani et al., 2019; Jafari et al., 2019), Румынии, Турции (Faria et al., 2006; Turan et al., 2010, 2015) и Украины (Mezhzherin et al., 2009; Vernygora et al., 2018). Молекулярно-генетический анализ *A. tanaica* и *A. kessleri* из вод Понто-Каспийского бассейна до настоящего времени не выполняли.

В то же время результаты многочисленных исследований показывают, что видовая идентифи-

кация представителей рода *Alosa* с применением различных генетических маркеров зачастую проблематична из-за отсутствия соответствия между морфологическими признаками изучаемых особей и данными генетического анализа (Boisneau et al., 1992; Mezhzherin et al., 2009; Dobrovolov et al., 2012; Vernygora et al., 2018), что требует поиска более специфических и многомолекулярных биомаркеров (Сулейманов, 2017).

Наше сообщение посвящено результатам сравнительного анализа полиморфизма первой субъединицы гена цитохромоксидазы (*COI*) митохондриальной ДНК (мтДНК) у четырёх видов пузанковых сельдей Понто-Каспийского бассейна (*A. braschnikowi*, *A. immaculata*, *A. kessleri*, *A. tanaica*), тихоокеанской сельди *Clupea pallasii*, европейского шпрота *Sprattus sprattus* и черноморско-каспийской тюльки *Clupeonella cultriventris* с целью выявления пригодности этого маркера для генетической идентификации видов рода *Alosa* в бассейнах Азовского, Чёрного и Каспийского морей и поиска альтернативных генетических маркеров для надёжного разделения видов рассматриваемой группы. В связи с увеличением в последние годы объёма контрафактной и фальсифицированной рыбной продукции (Торопова и др., 2019) поиск надёжных генетических маркеров приобретает особую актуальность.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выборки понто-каспийских пузанковых сельдей в 2021 г. собраны в реках (Сулак и Дон) и в Таганрогском заливе Азовского моря в процессе проведения научных исследований АзНИИРХ (сетями) и любительского учебного лова в мае–июне – в период, на который приходится нерест сельдей в Каспийском море и Азово-Черноморском бассейне (Казанова, Халдинова, 1940; Васильева, 2007; Васильева, Лужняк, 2013; Зубкова, Разинков, 2022).

Для видовой идентификации понто-каспийских пузанковых сельдей в полевых и лабораторных условиях использовали наиболее авторитетные источники, содержащие таксономические описания и определительные ключи (Световидов, 1952; Whitehead, 1985; Васильева, 2007; Богущкая и др., 2013; Васильева, Лужняк, 2013). Основными морфологическими признаками для различения видов служили наличие зубов на челюстях и сошнике, относительные размеры рыла и глаза, форма тела, число жаберных тычинок на первой жаберной дуге и их длина относительно жаберных лепестков. Видовую идентификацию выловленных экземпляров осуществляли непо-

средственно авторы или их квалифицированные коллеги. Образцы тканей (фрагменты грудных плавников) фиксировали в 96%-ном этаноле. Информация по материалу, на котором основано исследование, представлена в табл. 1.

Выделение и очистку ДНК проводили с использованием набора для выделения ДНК Wizard SV 96 Genomic DNA Purification System (Promega, США) в соответствии с протоколом производителя. Для амплификации фрагмента гена *COI* использовали праймеры FishF2\_tF TG TAAACGACGGCCAGTTCGACTAATCATAAA GATATCGGCAC, FishR2\_tR CAGGAAACAGC-TATGACACTTCAGGGTGTACCGAAGAAT-CAGAA. Реакцию амплификации проводили по следующей программе: 3 мин денатурации ДНК при 95°C; 35 циклов (по 30 с) денатурации матрицы ДНК при 95°C; 30 с отжига праймеров при 52°C и элонгация синтеза 30 с при 72°C. Затем окончательная элонгация 10 мин при 72°C. После полимеразной цепной реакции (ПЦР) полученный продукт в объёме 3 мкл очищали от примесей осаждением этанолом (Silva et al., 2001). Реакцию секвенирования проводили с использованием праймера FishF2\_tF и набора реагентов BigDye v.1 (Applied Biosystems, США). Для реакции секвенирования брали 0.4 пмоль очищенного продукта ПЦР и 3.2 пмоль праймера. После реакции секвенирования полученный продукт объёмом 0.5 мкл растворяли в 15 мкл формамида (Silva et al., 2001) и денатурировали 5 мин при 95°C. Секвенирование образцов ДНК пузанковых сельдей проводили на приборе ABI Prism 3130xl по протоколу производителя (Applied Biosystems, США).

Полученные последовательности гена *COI* обрабатывали с применением пакета программ Geneious 8.1.8 (Drummond et al., 2011). Нуклеотидные последовательности образцов пузанковых сельдей были переведены в необходимый формат для построения гаплотипической сети в программе PopArt (Leigh, Bryant, 2015). Расчёт доли гаплотипов для каждого вида сельдей рода *Alosa* проводили в программе Excel 2010. Также в программе Geneious 8.1.8 построено филогенетическое дерево (модель Tamura-Nei) методом присоединения соседей (NJ – neighbor-joining method) (Saitou, Nei, 1987). Для построения дерева были взяты 30 экз. рыб – от каждого вида по несколько образцов. В качестве аутгруппы использовали нуклеотидную последовательность гена *COI* дальневосточной сардины-иваси *Sardinops melanosticta* (= *melanostictus*) (JF952843.1) (Bowen et al., 2008) из международной базы

Таблица 1. Сведения по выборкам образцов сельдевидных (*Clupeoidea*), использованных в работе

Вид	Выборка		Число образцов	Дата сбора	Место сбора	Номер в базе генетических данных**
	№	название*				
<i>Alosa braschnikovi</i>	1	AB_GB	3	—	Основная группа Иран	GBMND65829-21, GBMND65830-21, GBMND65831-21
	2	AI_Azov	25	16–25.06.2021 г.		
	3	AI_GB	3	05–06.2016 г.		
	4	AK_Sul	6	31.05–02.06.2021 г.		
	5	AK_Zalom	3	08.05.2021 г.		
	6	AT_Don	7	06.2021 г.		
	7	AT_Azov	26	16–25.06.2021 г.		
<i>Clupea pallasii</i>	8	CP_Ain	38	2010 г.	Сестринская группа оз. Айнское, Сахалин	OR189222–OR189259
	9	CP_Vil	9	2016 г.		
	10	CP_Jap	18	28.03.2017 г.		
	11	CP_Ber	18	2018 г.		
	12	CP_GB	3	—		
	13	CC_Azov	7	16–25.06.2021 г.		
	14	CC_GB	3	2003–2014 гг.		
<i>Clupeonella cultriventris</i>	15	SS_GB	3	2016–2021 гг.	Средиземное, Азовское и Чёрное моря	KJ552938, EEFF116-06, EEFF092-06
					Норвегия, Турция	MW075163.1, JQ624003.1, MN122923
					Аутгруппа	
<i>Sardinops melanosticta</i>			1	25.07.2016 г.	Япония	JF952843.1

Примечание. \*\*"GB" в названии выборки маркирует образцы, взятые из баз генетических данных для сравнительного анализа; \*\*двузначный буквенный код означает принадлежность к базе генетических данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), четырёхзначный – к базе генетических данных BOLD Systems (<https://www.boldsystems.org/>); "–" – нет данных.

данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Статистическую оценку дерева провели методом бутстреп-анализа с генерацией случайных чисел (975364) и числом репликаций 1000 (Картавцев, 2008).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты получены на основании анализа полиморфизма гена мтДНК *COI* длиной 588 пар нуклеотидов (п.н.) 172 особей различных видов семейств Alosidae, Clupeidae и Ehiravidae (все последовательности, даже из баз данных, были обрезаны до одинакового числа п.н.). Всего в процессе исследования выявлено 49 гаплотипов: 15 гаплотипов тихоокеанской сельди, 3 гаплотипа европейского шпрота, 9 гаплотипов черноморско-каспийской тюльки и 22 гаплотипа видов сельдей рода *Alosa*. На основе последовательностей гена *COI* построена сеть гаплотипов (рис. 1).

Тихоокеанская сельдь, европейский шпрот и черноморско-каспийская тюлька хорошо различимы между собой и дифференцированы от представителей рода *Alosa*. На исследованном участке абсолютное число нуклеотидных замен между тихоокеанской сельдью и видами рода *Alosa* составляет 79, между тихоокеанской сельдью и европейским шпротом – 44, между европейским шпротом и черноморско-каспийской тюлькой – 88. Однако внутри рода *Alosa* идентифицировать виды с помощью выбранного маркера не представляется возможным. С одной стороны, образцы, отобранные от морфологически различающихся особей и идентифицированные как разные виды, имеют одинаковые гаплотипы. С другой стороны, образцы, относящиеся к разным видам, различаются между собой на незначительное число нуклеотидных замен. При этом образ-

цы, принадлежащие к разным видам, значительно перемешаны между собой (рис. 1). Например, гаплотипы *A. tanaica* (AT\_Don) распределены по гаплотипической сети хаотично. То же можно сказать и про *A. immaculata* (AI\_Azov), у которой максимальное число нуклеотидных замен между образцами равно 8, при этом максимальное число мутаций между всеми видами сельдей рода *Alosa* составляет 7. Для убедительной демонстрации написанного выше массовые гаплотипы, которые встречаются у разных видов исследованных сельдей рода *Alosa*, представлены в табл. 2.

Обнаружено, что один и тот же гаплотип *H4* встречается у всех четырех видов рода *Alosa*. Гаплотип *H2* встречается у *A. immaculata* и *A. tanaica*, а гаплотип *H5* – у *A. immaculata* и *A. kessleri*. Эти данные свидетельствуют об отсутствии генетической дифференциации исследованных видов сельдей рода *Alosa* на отдельные виды и группы видов при использовании ДНК-штрихкодирования с использованием нуклеотидных последовательностей гена *COI*. На основании анализа нуклеотидных последовательностей 30 образцов разных видов сельдевидных построено филогенетическое дерево с бутстреп-поддержкой (рис. 2), которое не позволило выявить межвидовую дифференциацию у исследованных сельдей рода *Alosa*. В одну группу со 100%-ной бутстреп-поддержкой попали все исследуемые виды сельдей.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе проведения предшествующих молекулярно-генетических исследований пузанковых сельдей рода *Alosa* были применены различные генетические маркеры, в том числе энзимы и аллозимы (Boisneau et al., 1992; Alexandrino

**Таблица 2.** Встречаемость общих гаплотипов гена *COI* у исследованных видов сельдей рода *Alosa*

Гаплотип	Вид	Число образцов	Доля особей, %
<i>H1</i>	<i>A. tanaica</i>	5	100.0
<i>H2</i>	<i>A. immaculata</i>	9	64.3
	<i>A. tanaica</i>	5	35.7
<i>H3</i>	<i>A. immaculata</i>	9	42.9
	<i>A. tanaica</i>	12	57.1
<i>H4</i>	<i>A. braschnikowi</i>	3	23.1
	<i>A. immaculata</i>	2	15.4
	<i>A. kessleri</i>	6	46.2
	<i>A. tanaica</i>	2	15.4
<i>H5</i>	<i>A. immaculata</i>	2	66.7
	<i>A. kessleri</i>	1	33.3



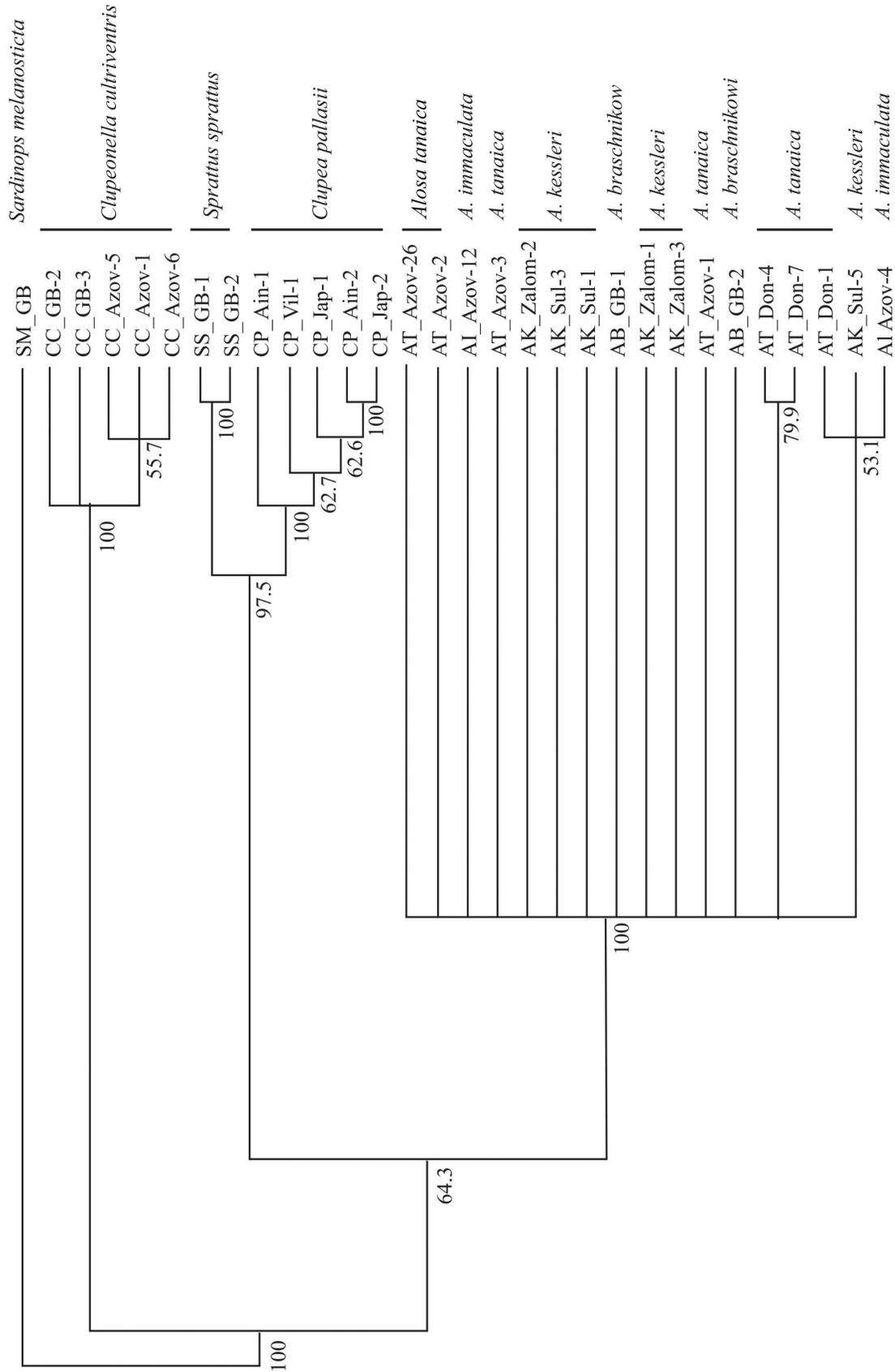


Рис. 2. Филогенетическое дерево исследованных сельдевидных (Clupeoidea) с бутстреп-поддержкой, построенное на основании нуклеотидных последовательностей гена *COI*: в узлах указано значение поддержки, %; после названия выборки приведен порядковый номер образца.

et al., 2006; Mezhzherin et al., 2009; Dobrovolo et al., 2012), микросателлиты (Boisneau et al., 1992; Julian, Bartron, 2007; Mickle et al., 2015; Jafari et al., 2019; Sabatino et al., 2022), гены митохондриальных ДНК и РНК (*COI*, *Cyt b*, *ND*, *NADH*, *6S*, *12S*, *16S*, *D-loop*) (Alexandrino et al., 2006; Li, Ortí, 2007; Bowen et al., 2008; Turan et al., 2010, 2015; Faria et al., 2011, 2012; Chiesa et al., 2014; Giantsis et al., 2015; Plough et al., 2018; Vernygora et al., 2018; Bani et al., 2019; Ogburn et al., 2023), ядерные гены (*RAG1* и *RAG2*) (Li, Ortí, 2007), случайно амплифицируемая полиморфная ДНК – RAPD (Сулейманов, 2017) и одиночные нуклеотидные полиморфизмы – SNP (Faria et al., 2011; Vernygora et al., 2018). Результаты этих исследований продемонстрировали различную эффективность генетических маркеров для видовой идентификации представителей рода *Alosa*. В отношении дискриминации наиболее изученных европейских *A. alosa* и *A. fallax* с помощью молекулярно-генетических подходов хорошо зарекомендовали себя такие митохондриальные маркеры, как *Cyt b* и *ND1* (Faria et al., 2011, 2012; Chiesa et al., 2014), но неэффективными для разделения этих видов оказались аллозимы (Boisneau et al., 1992). Однако сочетание *Cyt b* с аллозимами позволило Александрино с соавторами (Alexandrino et al., 2006) добиться надёжной дискриминации указанных видов.

Разнообразные генетические маркеры были успешно опробованы для различения североамериканских видов. Так, *A. pseudoharengus* и *A. aestivalis* хорошо различаются с помощью *COI* (Plough et al., 2018; Ogburn et al., 2023) и при использовании полного митогенома (Lavoué et al., 2007). В то же время с помощью мтДНК-маркеров *ND1* и *Cyt b* удалось дискриминировать *A. alabamiae*, *A. sapidissima*, *A. alosa*, *A. fallax*, *A. immaculata*, *A. mediocris* и *A. chrysochloris*, но попытка разделить *A. pseudoharengus* и *A. aestivalis* оказалась неудачной (Bowen et al., 2008). Ли и Орти (Li, Ortí, 2007) успешно дискриминировали *A. sapidissima*, *A. chrysochloris*, *A. pseudoharengus* и *A. aestivalis* с помощью генов *12S* и *16S* митохондриальной РНК и ядерных маркеров *RAG1* и *RAG2*.

Более сложная ситуация наблюдается в отношении понто-каспийских видов рода *Alosa*. С помощью 19 энзимных локусов не удалось выявить принципиальных различий между *A. caspia*, *A. maeotica* и *A. immaculata* (Mezhzherin et al., 2009). Невысокую разрешающую способность продемонстрировали в отношении *A. immaculata* и *A. caspia* аллозимные маркеры (Dobrovolo et al., 2012). Успешно дискриминировать *A. fallax nilotica*, *A. caspia*, *A. maeotica*, *A. immacu-*

*lata* и *A. tanaica* удалось турецким учёным (Turan et al., 2015) с использованием целого комплекса митохондриальных маркеров – *NADH3/4*, *NADH5/6*, *Cyt b*, *COX*, *D-loop* и *16SrRNA*. В то же время при помощи митохондриальных маркеров *COI* и *Cyt b*, а также тонких методов генетического анализа (SNP) не удалось разделить в выборках из Азовского моря *A. caspia* и *A. immaculata* (Vernygora et al., 2018). Возможная причина этого может быть связана с методически некорректным сбором образцов для генетического анализа (не нерестовые группировки в двух близких географических нагульных локальностях в Азовском море).

Различная эффективность одних и тех же генетических маркеров для дифференциации представителей сельдей рода *Alosa*, по нашему мнению, может быть обусловлена следующими причинами:

1. Некорректная идентификация видов в уловах, поскольку пузанковые сельди обладают высокой морфологической пластичностью и у многих видов основные внешние морфологические признаки (пропорции тела и число тычинок на первой жаберной дуге) зачастую перекрываются (Световидов, 1952; Whitehead, 1985; Васильева, 2007; Богущая и др., 2013; Васильева, Лужняк, 2013; Сулейманов, 2017).

2. Недавнее по меркам биологической эволюции время видообразования пузанковых сельдей рода *Alosa* (Borodin, 1927; Bowen et al., 2008; Dobrovolo et al., 2012; Chiesa et al., 2014; Vernygora et al., 2018).

3. Различная доля межвидовых гибридов, которая в разных популяциях одного и того же вида может значительно варьировать (Boisneau et al., 1992; Faria et al., 2004, 2011, 2012; Alexandrino et al., 2006; Jolly et al., 2011; Sotelo et al., 2014; Taillebois et al., 2020; Antognazza et al., 2022).

Ранее было показано, что разделение отдельных видов сельдей Понто-Каспийского бассейна с применением генетических маркеров затруднено из-за явного генетического сходства некоторых видов, что послужило основанием для мнения о конспецифичности *A. immaculata*, *A. caspia* и *A. maeotica*, которые являются лишь разными экологическими формами одного вида (Mezhzherin et al., 2009; Vernygora et al., 2018). Одна из возможных причин слабой генетической дифференциации пузанковых сельдей Понто-Каспийского бассейна связана с их эволюционной историей. Многие авторы сходятся во мнении, что формирование этих видов было обусловлено обособлением Каспийского и Азо-

во-Черноморского бассейнов, которое произошло в межледниковый период в плейстоцене (Borodin, 1927; Vernygora et al., 2018). На этот же период приходится формирование анадромных и пресноводных популяций *A. fallax* в водах Италии (Chiesa et al., 2014), а также североамериканских видов *Alosa* (Bowen et al., 2008). Хорошо известно, что ДНК-штрихкодирование, основанное на применении митохондриальных маркеров (*COI*, *Cyt b* и других), зачастую оказывается неэффективным по отношению к молодым, недавно дивергировавшим видам (Шнеер, 2009; Гордеева, Шаховской, 2017; Орлова и др., 2018; Chernova et al., 2019; Картавцев, Редин, 2019). Поскольку пузанковых сельдей с уверенностью можно отнести к молодым видам, низкая эффективность генов мтДНК для их видовой генетической идентификации представляется вполне логичной.

Наш опыт популяционно-генетических исследований морской и озёрной форм тихоокеанской сельди (Orlova et al., 2021; Nedoluzhko et al., 2022) показал, что митохондриальные маркеры не всегда могут дифференцировать генетические различия у сельдей. После секвенирования образцов морской и озёрной форм тихоокеанской сельди, поиска дифференцирующих SNP мы нашли те маркеры, которые однозначно позволяют дифференцировать не только формы, но и отдельные популяции. Поэтому мы предлагаем решать поставленную в статье проблему при помощи ядерных маркеров. Методом секвенирования нового поколения (ddRAD) (Maroso et al., 2018) в ядерном геноме можно обнаружить однонуклеотидные замены, способные дифференцировать виды сельдей рода *Alosa*, экологические формы (если таковые имеются) и популяции внутри вида.

Другой возможной причиной, затрудняющей видовую идентификацию и понимание филогенетических связей пузанковых сельдей на основе генетического анализа с использованием митохондриальных маркеров, является наличие характерной для симпатрически распространённых видов рода *Alosa* межвидовой гибридизации. Это явление свойственно молодым, недавно дивергировавшим видам (Шнеер, 2009; Картавцев, Редин, 2019), к которым относятся и многие представители рода *Alosa*. В наибольшей степени такой феномен характерен для европейских видов *A. alosa* и *A. fallax*, в разных популяциях которых степень гибридизации может значительно варьировать (Boisneau et al., 1992; Faria et al., 2004, 2011, 2012; Alexandrino et al., 2006; Jolly et al., 2011; Sotelo et al., 2014; Taillebois et al., 2020; An-

tognazza et al., 2022). Отмечены случаи гибридизации и между североамериканскими видами шэдов (Hubert et al., 2008; McBride et al., 2014). Сведения о наличии межвидовой гибридизации между пузанковыми сельдями Понто-Каспийского бассейна до сих пор отсутствуют.

Поскольку с помощью митохондриальных маркеров невозможно обнаружить наличие межвидовой гибридизации, решение проблемы требует применения ядерных маркеров. В качестве начального шага на этом пути предполагается найти ядерные маркеры, чётко дифференцирующие виды пузанковых сельдей (полногеномное генотипирование или полногеномное секвенирование), и уже дальше по выбранным маркерам анализировать возможные гибриды.

Усиление межвидовой гибридизации между европейскими представителями рода *Alosa* в современный период связывают с нарушением их местообитаний, преимущественно в результате зарегулирования стока рек (Jolly et al., 2011; Antognazza et al., 2022). Крупные реки Понто-Каспийского бассейна (Волга, Дон, Днепр и другие) в течение первой половины XX столетия подверглись крупномасштабному гидростроительству с зарегулированием почти на всём протяжении основных стоков и превращением в цепочку водохранилищ (Слынько и др., 2010б), что привело практически к потере речных нерестилищ анадромных видов пузанковых сельдей. Результаты недавних исследований (Казачков, 2004; Пятикопова, 2018) показывают, что *A. caspia* и *A. saposchnikowii* постепенно отказались от использования речных нерестилищ, а нерест *A. kessleri* после зарегулирования стока р. Волга проходит только на незарегулированном её участке, где сохранилось основное русло. Таким образом, после зарегулирования стока рек Понто-Каспийского бассейна здесь сложились условия, способствующие межвидовой гибридизации пузанковых сельдей за счёт использования одних и тех же участков в качестве нерестилищ. Межвидовая гибридизация вкупе с негативным антропогенным воздействием (зарегулирование стока рек, разрушение местообитаний, загрязнение, браконьерство и др.) для популяций сельдей Понто-Каспийского бассейна представляют серьёзную опасность и могут привести к дальнейшему снижению их численности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку традиционное ДНК-штрихкодирование для видовой идентификации сельдей рода *Alosa* Понто-Каспийского бассейна с ис-

пользованием гена *COI* (и других митохондриальных маркеров) невозможно, предлагается применять в дальнейшем для этих целей единичные нуклеотидные замены (SNP), используя для их поиска полногеномное генотипирование или метод ddRAD.

В процессе проведения исследований выявлено несколько заслуживающих пристального внимания белых пятен, на ликвидацию и решение которых следует направить усилия в ближайшем будущем по нескольким направлениям.

Первое направление связано с крайне слабой изученностью таксономического положения и филогенетических связей килек рода *Clupeonella*, в котором настоящее время насчитывается семь валидных видов (Fricke et al., 2023; Froese, Pauly, 2023), подавляющее большинство которых (*C. abrau*, *C. caspia*, *C. cultriventris*, *C. engrauliformis*, *C. grimmi*, *C. tscharchalensis*) распространены в Понто-Каспийском бассейне, а *C. muhlisi* – в турецком оз. Улубат бассейна Мраморного моря. Между тем до сих пор большинство немногочисленных генетических исследований килек ограничивались анализом внутривидовой организации отдельных видов (Laloei et al., 2009; Слынько и др., 2010а; Nogouzi et al., 2012), а изучение их родственных связей выполнено только на выборках *C. cultriventris*, *C. engrauliformis* и *C. grimmi* из Южного Каспия (Laloei et al., 2005). При этом в банках генетических данных – NCBI и BOLD Systems (<https://www.boldsystems.org/>) – представлены нуклеотидные последовательности только одного из семи видов – *C. cultriventris*.

Другим белым пятном (направлением) остаётся таксономическое положение и внутривидовая структура широко распространённой в водах Европы, Средиземного моря и Понто-Каспийского бассейна южноевропейской атерины *Atherina boyeri*. До сих пор генетические исследования этого вида были сосредоточены на анализе популяционной структуры и базировались на сборах преимущественно из Средиземного моря (Klossa-Kilia et al., 2002; Astolfi et al., 2005; Milana et al., 2008, 2012; Boudinar et al., 2016). Внутривидовая организация атерины в пределах Понто-Каспийского бассейна остаётся неисследованной, а в банках генетических данных (NCBI, BOLD Systems) представлены нуклеотидные последовательности этого вида только из вод Европы и Средиземного моря и полностью отсутствуют из Понто-Каспийского бассейна.

Наконец, учитывая общую эволюционную историю понто-каспийских сельдей, килек и атерины, результаты сравнительного генетического

анализа могли бы предоставить новые и весьма интересные данные для реконструкции микро- и макроэволюционных процессов, происходивших в прошлом в популяциях пелагических рыб (включая пузанковых сельдей), населяющих ныне акваторию Понто-Каспийского бассейна.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность Д.С. Курносову (Тихоокеанский филиал ВНИРО – ТИПРО) и В.А. Якухину (ООО “МИС”) за помощь в сборе материалов по тихоокеанской сельди и *A. tanaica*, а также А.А. Сергееву (ВНИРО) за помощь в проведении видовой идентификации и биологического анализа *A. tanaica*. Мы искренне благодарны двум анонимным рецензентам за внимательное прочтение рукописи и высказанные ценные критические замечания, которые позволили значительно улучшить качество работы.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Подготовка работы выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-24-01036 “Генетические особенности эволюционных процессов при образовании экологических форм сельди *Clupea pallasii* и близких к ней биологических видов”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Богущая Н.Г., Насека А.М. 2004. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М.: Т-во науч. изд. КМК, 389 с.
- Богущая Н.Г., Кияшко П.В., Насека А.М., Орлова М.И. 2013. Определитель рыб и беспозвоночных Каспийского моря. Т. 1. Рыбы и моллюски. СПб.: Т-во науч. изд. КМК, 543 с.
- Васькина Е.Д. 2007. Рыбы Черного моря. Определитель морских, солоноватоводных, эвригаллиных и проходных видов с цветными иллюстрациями, собранными С.В. Богородским. М.: Изд-во ВНИРО, 238 с.
- Васькина Е.Д., Лужняк В.А. 2013. Рыбы бассейна Азовского моря. Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 272 с.
- Гаджикурбанов Т.Т., Зурхаева У.Д., Устарбекова Д.А. и др. 2012. Морфологическая характеристика сельдей в западной части Среднего Каспия // Изв. ДГПУ. Естественные и точные науки. № 3. С. 49–54.
- Гордеева Н.В., Шаховской И.Б. 2017. Применение ДНК-баркодинга для идентификации видов и филогенетических исследований летучих рыб (Exocoetidae) // Вопр. ихтиологии. Т. 57. № 2. С. 212–221. <https://doi.org/10.7868/S0042875217020126>
- Зубкова Т.С., Разинков В.П. 2022. Морские мигрирующие сельди Каспийского моря // Вопр. рыболовства. Т. 23. № 2. С. 51–62. <https://doi.org/10.36038/0234-2774-2022-23-2-51-62>
- Казанова И.И., Халдинова Н.А. 1940. Места и условия нереста каспийских сельдей в дельте Волги (по рас-

- пределению их икры и личинок) // Тр. ВНИРО. Т. 14. С. 77–108.
- Казачков Г.В. 2004. О развитии отечественной таксономии сельдей рода *Alosa* (Pisces, Clupeiformes, Clupeidae), известных в XIX веке под названием “бешенка” (по литературным источникам) // Поволж. экол. журн. Т. 3. С. 277–284.
- Картавец Ю.Ф. 2008. Молекулярная эволюция и популяционная генетика. Владивосток: Изд-во ДГУ, 562 с.
- Картавец Ю.Ф., Редин А.Д. 2019. Оценки генетической интрогрессии, ретикуляции генных деревьев, дивергенции таксонов и состоятельности ДНК-штрихкодирования по молекулярным маркерам генов // Успехи соврем. биологии. Т. 139. № 1. С. 3–24.  
<https://doi.org/10.1134/S004213241901006X>
- Кукуев Е.И., Орлов А.М. 2018. Новый подвид финты – балтийская финта *Alosa fallax balticus* (Clupeidae) // Биология внутр. вод. Т. 4. С. 28–37.  
<https://doi.org/10.1134/S0320965218040113>
- Малкин Е.М., Андрианова С.Б. 2008. Биология и особенности формирования численности большеглазого пузанка *Alosa saposchnikowii* // Вопр. ихтиологии. Т. 48. № 4. С. 485–493.
- Орлова С.Ю., Орлов А.М., Байталюк А.А. и др. 2018. Разнообразие гена *COI* митохондриальной ДНК у представителей рода *Antimora* (Moridae, Gadiformes, Teleostei) // Докл. РАН. Т. 482. № 6. С. 722–727.  
<https://doi.org/10.31857/S086956520002949-6>
- Пятикопова О.В. 2018. Покатная миграция личинок и молоди сельди-черноспинки в незарегулированной части реки Волги (2016–2017 гг.) // Вестн. НГАУ. № 2. С. 72–80.
- Световидов А.Н. 1952. Фауна СССР. Рыбы. Сельдевые (Clupeidae). Т. 2. Вып. 1. М.; Л.: Наука, 331 с.
- Слынько Ю.В., Карабанов Д.П., Столбунова В.В. 2010а. Генетический анализ внутривидовой структуры черноморско-каспийской тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) (Actinopterygii: Clupeidae) // Докл. РАН. Т. 433. № 2. С. 283–285.
- Слынько Ю.В., Дзебуадзе Ю.Ю., Новицкий Р.А., Христов О.А. 2010б. Инвазии чужеродных рыб в бассейнах крупнейших рек Понто-Каспийского бассейна: состав, векторы, инвазионные пути и темпы // Рос. журн. биол. инвазий. Т. 3. № 4. С. 74–89.
- Сулейманов С.Ш. 2017. Популяционно-генетический анализ бражниковских сельдей *Alosa braschnikowi* (Borodin, 1904) Каспийского моря // Adv. Biol. Earth Sci. V. 2. № 1. P. 103–111.
- Торопова Н.В., Мехдиев Э.Т., Лебедев И.А. 2019. Актуальные проблемы потребления продовольствия: потребление фальсифицированной и контрафактной продукции // Экономика: вчера, сегодня, завтра. Т. 9. № 10А. С. 630–638.  
<https://doi.org/10.34670/AR.2020.91.10.071>
- Шнеер В.С. 2009. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // Журн. общ. биологии. Т. 70. № 4. С. 296–315.
- Alexandrino P., Faria R., Linhares D. et al. 2006. Interspecific differentiation and intraspecific substructure in two closely related clupeids with extensive hybridization, *Alosa alosa* and *Alosa fallax* // J. Fish Biol. V. 69. № sb. P. 242–259.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01289.x>
- Antognazza C.M., Sabatino S.J., Britton R.J. et al. 2022. Hybridization and genetic population structure of *Alosa* population in the United Kingdom // Ibid. V. 101. № 2. P. 408–413.  
<https://doi.org/10.1111/jfb.14917>
- Astolfi L., Dupanloup I., Rossi R. et al. 2005. Mitochondrial variability of sand smelt *Atherina boyeri* populations from north Mediterranean coastal lagoons // Mar. Ecol. Prog. Ser. V. 297. P. 233–243.  
<https://doi.org/10.3354/meps297233>
- Bani A., Khataminejad S., Vaziri H.R., Haseli M. 2019. The taxonomy of *Alosa caspia* (Clupeidae: Alosinae), using molecular and morphometric specifications, in the South Caspian Sea // Eur. Zool. J. V. 86. № 1. P. 156–172.  
<https://doi.org/10.1080/24750263.2018.1559366>
- Boisneau P., Mennesson-Boisneau C., Guyomard R. 1992. Electrophoretic identity between allis shad, *Alosa alosa* (L.), and twaite shad, *A. fallax* (Lacepede) // J. Fish Biol. V. 40. № 5. P. 731–738.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1992.tb02620.x>
- Borodin N.A. 1927. Changes of environment as cause of the origin of varieties or subspecies // Am. Nat. V. 61. № 674. P. 266–271.  
<https://doi.org/10.1086/280149>
- Boudinar A.S., Chaoui L., Quignard J.P. et al. 2016. Otolith shape analysis and mitochondrial DNA markers distinguish three sand smelt species in the *Atherina boyeri* species complex in western Mediterranean // Estuar. Coast. Shelf Sci. V. 182. Pt. A. P. 202–210.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.09.019>
- Bowen B.R., Kreiser B.R., Mickle P.F. et al. 2008. Phylogenetic relationships among North American *Alosa* species (Clupeidae) // J. Fish Biol. V. 72. № 5. P. 1188–1201.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01785.x>
- Chernova N.V., Voskoboinikova O.S., Kudryavtseva O.Y. et al. 2019. Taxonomic status of the Okhotsk lump sucker *Eumicrotremus ochotonensis* (Cylopteridae, Cottoidei) with redescription of *E. derjugini* // J. Ichthyol. V. 59. № 3. P. 289–306.  
<https://doi.org/10.1134/S0032945219030032>
- Chiesa S., Lucentini L., Piccinini A. et al. 2014. First molecular characterization of twaite shad *Alosa fallax* (Lacepede, 1803) from Italian populations based on Cytochrome *b* gene sequencing // Ital. J. Freshw. Ichthyol. V. 1. № 1. P. 9–18.
- Coad B.W. 2017. Review of the herrings of Iran (Family Clupeidae) // Int. J. Aquat. Biol. V. 5. № 3. P. 128–192.  
<https://doi.org/10.22034/ijab.v5i3.282>
- Dayrat B. 2005. Towards integrative taxonomy // Biol. J. Linn. Soc. V. 85. № 3. P. 407–417.  
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>
- Dobrovolsky I., Ivanova P., Georgiev Z. et al. 2012. Allozyme variation and genetic identification of shad species (Pisces:

- Clupeidae, genus *Alosa*) along Bulgarian Black Sea coast // *Acta Zool. Bulg.* V. 64. № 2. P. 175–183.
- Drummond A.J., Ashton B., Buxton S. et al. 2011. Geneious v5.4 (<http://www.geneious.com>. Version 06/2023).
- Dyldin Y.V., Orlov A.M., Hanel L. et al. 2022. Ichthyofauna of the fresh and brackish waters of Russia and adjacent areas: annotated list with taxonomic comments. 1. Families Petromyzontidae–Pristigasteridae // *J. Ichthyol.* V. 62. № 3. P. 385–414. <https://doi.org/10.1134/S0032945222030031>
- Esmaili H.R., Coad B.W., Mehraban H.R. et al. 2014. An updated checklist of fishes of the Caspian Sea basin of Iran with a note on their zoogeography // *Iran. J. Ichthyol.* V. 1. № 3. P. 152–184. <https://doi.org/10.22034/iji.v1i3.18>
- Faria R., Wallner B., Weiss S., Alexandrino P. 2004. Isolation and characterization of eight dinucleotide microsatellite loci from two closely related clupeid species (*Alosa alosa* and *A. fallax*) // *Mol. Ecol. Notes.* V. 4. № 4. P. 586–588. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00745.x>
- Faria R., Weiss S., Alexandrino P. 2006. A molecular phylogenetic perspective on the evolutionary history of *Alosa* spp. (Clupeidae) // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 40. № 1. P. 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.02.008>
- Faria R., Pinheiro A., Gabaldón T. et al. 2011. Molecular tools for species discrimination and detection of hybridization between two closely related Clupeid fishes *Alosa alosa* and *A. fallax* // *J. Appl. Ichthyol.* V. 27. № s3. P. 16–20. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01846.x>
- Faria R., Weiss S., Alexandrino P. 2012. Comparative phylogeography and demographic history of European shads (*Alosa alosa* and *A. fallax*) inferred from mitochondrial DNA // *BMC Evol. Biol.* V. 12. Article 194. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-194>
- Fricke R., Eschmeyer W.N., Fong J.D. (eds.). 2023. Eschmeyer's catalog of fishes: Genera/Species by Family/Subfamily (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Version 06/2023).
- Froese R., Pauly D. (eds.). 2023. FishBase. World Wide Web electronic publication ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org). Version 06/2023).
- Gaudant J. 1991. Paleontology and history of clupeoid fishes // *The freshwater fishes of Europe*. Wiesbaden: Aula Verlag. P. 32–44.
- Giantsis I.A., Kechagia S., Apostolidis A.P. 2015. Evaluating the genetic status of the IUCN vulnerable endemic Macedonian shad (*Alosa macedonica*, Vinciguerra, 1921) from Lake Volvi // *J. Appl. Ichthyol.* V. 31. № 1. P. 184–187. <https://doi.org/10.1111/jai.12494>
- Hubert N., Hanner R., Holm E. et al. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes // *PLoS One.* V. 3. № 6. Article e2490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002490>
- Jafari O., Shabany A., Miandare H.K. 2014. A study of genetic population of *Alosa braschnicowi* (Borodin, 1904) in Sari and Mahmodabad coasts in the Caspian Sea, using microsatellite loci // *Int. J. Aquat. Biol.* V. 2. № 1. P. 20–26. <https://doi.org/10.22034/ijab.v2i1.19>
- Jafari O., Fernandes J.M.O., Hedayati A et al. 2019. Microsatellite analysis of five populations of *Alosa braschnicowi* (Borodin, 1904) across the southern coast of the Caspian Sea // *Front. Genet.* V. 10. Article 760. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00760>
- Jolly M.T., Maitland P.S., Genner M.J. 2011. Genetic monitoring of two decades of hybridization between allis shad (*Alosa alosa*) and twaite shad (*Alosa fallax*) // *Conserv. Genet.* V. 12. № 4. P. 1087–1100. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0211-3>
- Julian S.E., Bartron M.L. 2007. Microsatellite DNA markers for American shad (*Alosa sapidissima*) and cross-species amplification within the family Clupeidae // *Mol. Ecol. Notes.* V. 7. № 5. P. 805–807. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01710.x>
- Klossa-Kilia E., Prassa M., Papatotiropoulos et al. 2002. Mitochondrial DNA diversity in *Atherina boyeri* populations as determined by RFLP analysis of three mtDNA segments // *Heredity.* V. 89. № 5. P. 363–370. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800144>
- Laloei F., Fazli H., Nayerani M. et al. 2005. Genetic variation of Clupeonidae (*Clupeonella cultriventris*, *C. engrauliformis* and *C. grimmii*) in southern part of Caspian Sea as revealed by RFLP Analysis. Tehran: Fish. Res. Inst. Iran, 58 p.
- Laloei F., Eimanifar A., Rezvani S. 2009. Genetic variation of *Clupeonella engrauliformis* populations inferred from RFLP analysis of mitochondrial DNA *D-loop* region on the Southern coast of the Caspian Sea, Iran // *Asian Fish. Sci.* V. 22. № 3. P. 929–941. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2009.22.3.006>
- Lavoué S., Miya M., Saitoh K. et al. 2007. Phylogenetic relationships among anchovies, sardines, herrings and their relatives (Clupeiformes), inferred from whole mitogenome sequences // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 43. № 3. P. 1096–1105. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.09.018>
- Lavoué S., Konstantinidis P., Chen W.-J. 2014. Progress in Clupeiform systematics // *Biology and ecology of sardines and anchovies*. Boca Raton: CRC Press. P. 3–42. <https://doi.org/10.1201/b16682-6>
- Leigh J.W., Bryant D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction // *Methods. Ecol. Evol.* V. 6. № 9. 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Li C., Ortí G. 2007. Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences // *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 44. № 1. P. 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.10.030>
- Maroso F., Hillen J.E.J., Pardo B.G. et al. 2018. Performance and precision of double digestion RAD (ddRAD) genotyping in large multiplexed datasets of marine fish species // *Mar. Genom.* V. 39. P. 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2018.02.002>
- McBride M.C., Willis T.V., Bradford R.G., Bentzen P. 2014. Genetic diversity and structure of two hybridizing anadromous fishes (*Alosa pseudoharengus*, *Alosa aestivalis*) across the northern portion of their ranges // *Conserv. Genet.* V. 15. № 6. P. 1281–1298. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0617-9>

- Mezhzherin S.V., Fedorenko L.V., Verlatyi D.B. 2009. Differentiation and allozyme variability of shads genus *Alosa* (Clupeiformes, Alosiinae) from Azov-Black Sea basin // Cytol. Genet. V. 43. № 2. P. 118–122. <https://doi.org/10.3103/S0095452709020078>
- Mickle P.F., Franks J.S., Kreiser B.R. et al. 2015. First molecular verification of a marine-collected specimen of *Alosa alabamae* (Teleostei: Clupeidae) // Southeast. Nat. V. 14. № 3. P. 596–601. <https://doi.org/10.1656/058.014.0315>
- Milana V., Sola L., Congiu L., Rossi A.R. 2008. Mitochondrial DNA in *Atherina* (Teleostei, Atheriniformes): differential distribution of an intergenic spacer in lagoon and marine forms of *Atherina boyeri* // J. Fish Biol. V. 73. № 5. P. 1216–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01994.x>
- Milana V., Franchini P., Sola L. et al. 2012. Genetic structure in lagoons: the effects of habitat discontinuity and low dispersal ability on populations of *Atherina boyeri* // Mar. Biol. V. 159. № 2. P. 399–411. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1817-1>
- Nedoluzhko A., Orlova S.Yu., Kurnosov D.S. et al. 2022. Genomic signatures of freshwater adaptation in Pacific herring (*Clupea pallasii*) // Genes. V. 13. № 10. Article 1856. <https://doi.org/10.3390/genes13101856>
- Nelson J.S., Grande T., Wilson M.V.H. 2016. Fishes of the World. Hoboken: John Wiley and Sons, 752 p. <https://doi.org/10.1002/9781119174844>
- Norouzi M., Nazemi A., Pourkazemi M. 2012. Population genetic study on common kilka (*Clupeonella cultriventris* Nordmann, 1840) in the Southwest Caspian Sea (Gilan Province, Iran) using microsatellite markers // Afr. J. Biotechnol. V. 11. № 98. P. 16405–16411.
- Ogburn M.B., Plough L.V., Bangley C.W. et al. 2023. Environmental DNA reveals anadromous river herring habitat use and recolonization after restoration of aquatic connectivity // Environ. DNA. V. 5. № 1. P. 25–37. <https://doi.org/10.1002/edn3.348>
- Orlova S.Y., Rastorguev S., Bagno T. et al. 2021. Genetic structure of marine and lake forms of Pacific herring *Clupea pallasii* // PeerJ. V. 9. Article e12444. <https://doi.org/10.7717/peerj.12444>
- Pante E., Schoelinck C., Puillandre N. 2015. From integrative taxonomy to species description: one step beyond // Syst. Biol. V. 64. № 1. P. 152–160. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syu083>
- Plough L.V., Ogburn M.B., Fitzgerald C.L. et al. 2018. Environmental DNA analysis of river herring in Chesapeake Bay: a powerful tool for monitoring threatened keystone species // PLoS One. V. 13. № 11. Article e0205578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205578>
- Sabatino S.J., Faria R., Alexandrino P.B. 2022. Genetic structure, diversity, and connectivity in anadromous and freshwater *Alosa alosa* and *A. fallax* // Mar. Biol. V. 169. № 1. Article 2. <https://doi.org/10.1007/s00227-021-03970-4>
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. V. 4. № 4. P. 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Schlick-Steiner B.C., Steiner F.M., Seifert B. et al. 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity // Annu. Rev. Entomol. V. 55. № 1. P. 421–438. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085432>
- Silva W.A., Costa M.C.R., Valente V. et al. 2001. PCR template preparation for capillary DNA sequencing // BioTechniques. V. 30. № 3. P. 537–542. <https://doi.org/10.2144/01303st05>
- Sotelo G., Andree K.B., López M.A. et al. 2014. The puzzling demographic history and genetic differentiation of the twaite shad (*Alosa fallax*) in the Ebro River // Conserv. Genet. V. 15. № 5. P. 1037–1052. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0597-9>
- Taillebois L., Sabatino S., Manicki A. et al. 2020. Variable outcomes of hybridization between declining *Alosa alosa* and *Alosa fallax* // Evol. Appl. V. 13. № 4. P. 636–651. <https://doi.org/10.1111/eva.12889>
- Taverne L. 2004. Les poissons créacés de Nardò. 18°. *Pugliaclopea nolardi* gen. et sp. nov. (Teleostei, Clupeiformes, Clupeidae) // Boll. Mus. Civ. Stor. Nat. Verona. V. 28. P. 17–28.
- Turan C., Erguden D., Turan F. 2010. Phylogenetic relationship among the Black Sea *Alosa* species from mtDNA ND5/6 sequences // Rapp. Comm. Int. Mer Médit. V. 39. P. 687.
- Turan C., Ergüden D., Gürlek M. et al. 2015. Molecular systematic analysis of shad species (*Alosa* spp.) from Turkish marine waters using mtDNA genes // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. V. 15. № 1. P. 149–155. [http://doi.org/10.4194/1303-2712-v15\\_1\\_16](http://doi.org/10.4194/1303-2712-v15_1_16)
- Vernygora O.V., Davis C.S., Murray A.M., Sperling F.A.H. 2018. Delimitation of *Alosa* species (Teleostei: Clupeiformes) from the Sea of Azov: integrating morphological and molecular approaches // J. Fish Biol. V. 93. № 6. P. 1216–1228. <https://doi.org/10.1111/jfb.13847>
- Wang J., Yu Z., Wang X. et al. 2017. The next-generation sequencing reveals the complete mitochondrial genome of *Alosa sapidissima* (Perciformes: Clupeidae) with phylogenetic consideration // Mitochondrial DNA B: Resour. V. 2. № 1. P. 304–306. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1331322>
- Whitehead P.J.P. 1985. Clupeoid fishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, anchovies and wolf herrings. Pt. 1. Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae // FAO Fish. Synop. № 125. V. 7. 303 p.

## THE PROBLEMS OF DNA-BARCODING THE SHADS OF GENUS *ALOSA* (ALOSIDAE) OF THE PONTO-CASPIAN BASIN

S. Yu. Orlova<sup>1, 2</sup>, O. R. Emelyanova<sup>1, 3</sup>, N. A. Nebesikhina<sup>4</sup>, N. I. Rabazanov<sup>5, 6</sup>,  
and A. M. Orlov<sup>5, 6, 7, 8, 9, \*</sup>

<sup>1</sup>Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Shirshov Institute of Oceanology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Azov-Black Sea Branch of the Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Rostov-on-Don, Russia

<sup>5</sup>Dagestan State University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russia

<sup>6</sup>Caspian Institute of Biological Resources of the Dagestan Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russia

<sup>7</sup>Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>8</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

\*E-mail: orlov.am@ocean.ru

Numerous studies show that species identification of representatives of the genus *Alosa* using various genetic markers is often difficult and the search for more specific biomarkers is required. For the first time we analyzed polymorphism of *COI* gene fragment of mitochondrial DNA of two representatives of this genus (*A. tanaica* and *A. kessleri*), supplemented with new data on *A. immaculata*, from the waters of the Ponto-Caspian basin in comparative aspect with other representatives of the herring (*Clupeoidea*) genera *Alosa*, *Clupea*, *Clupeonella*, *Sprattus*, and *Sardinops*. The main result was the conclusion that within the genus *Alosa*, it is not possible to identify species using the marker used. On the one hand, specimens collected from morphologically distinct individuals and identified as different species have the same haplotypes. On the other hand, samples belonging to different species differ from each other by an insignificant number of nucleotide substitutions and do not form independent clades on the phylogram and haplotype network. This indicates the absence of genetic differentiation between the studied samples of herrings of genus *Alosa* into separate species and species groups when using DNA barcoding based on the *COI* gene. The reasons for such a phenomenon may be the following: 1) incorrect identification of species in catches, since shads (*Alosidae*) have high morphological flexibility and in many species, the main external morphological characters often overlap; 2) recent time of speciation by the standards of biological evolution for shads of genus *Alosa*; 3) difference in proportion of interspecific hybrids, which can vary significantly between populations of the same species.

**Keywords:** *Alosidae*, genetic differentiation, haplotype, interspecific hybridization, mitochondrial DNA *COI* gene, Azov Sea, Black Sea, Caspian Sea.