

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

Кафедра водных и наземных экосистем
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия
« ____ » _____ 20 __ г

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Степень дифференциации байкальского хариуса из
среднего течения реки Енисей по скорости роста и
морфологии отолитов

Тема

Руководитель



подпись, дата

доцент, к.б.н

должность, ученая степень

И. В. Зуев

инициалы, фамилия

Выпускник

28.06.21 

подпись, дата

Л. А. Парыгина

инициалы, фамилия

Красноярск, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Эффекты зарегулирования, оказывающие влияние на гидробионтов	5
1.1.1 Изменения в верхнем бьефе.....	5
1.1.2 Изменения в нижнем бьефе	7
1.2 Обзор методов идентификации скоплений рыб	9
1.2.1 Морфология.....	10
1.2.2 Геометрическая морфология	13
1.2.3 Генетическая изменчивость.....	14
1.2.3.1 Аллозимный электрофорез	14
1.2.3.2 Анализ митохондриальной ДНК	15
1.2.3.3 Анализ ядерной ДНК.....	16
1.2.4 Биохимический анализ	17
1.2.4.1 Микрохимия отолитов.....	18
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	19
2.1 Анализ изменчивости морфологии отолитов	19
2.2 Анализ изменчивости скорости роста	22
ГЛАВА 3. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	26
3.1 Результаты исследования	26
3.1.1 Морфология отолитов	26
3.1.2 Скорость роста	29
3.2 Обсуждение результатов.....	31
ВВЫВОДЫ	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	37

ВВЕДЕНИЕ

Зарегулирование рек различными гидротехническими сооружениями, в частности, строительство ГЭС существенно влияет на речные экосистемы. В верхнем бьефе образуются водохранилища, что существенно изменяет существующую экосистему. Крупные водохранилища затопляют большие площади земли, влияют на качество воды, накапливаемое в них. Вскоре после строительства плотин в образовавшихся водохранилищах может начаться процесс эвтрофирования, что в свою очередь делает воду непригодной для водоснабжения и снижает продуктивность рыб (Schmutz and Moog, 2018).

Для нижнего бьефа характерно изменение сезонного колебания температуры воды по сравнению с исходным состоянием, что значительно влияет на виды рыб со сложной пространственной организацией популяций, например, на их сезонные миграции в притоки. Режимы работы сброса воды влияют на речную систему русло-пойма. В частности, уменьшается сообщение между руслом реки и её поймы, что влияет на прибрежные сообщества животных, а также изменяет другие среды, которые обеспечивают важные места обитания для рыб, особенно для их молоди (Bunn, 2002; Schmutz and Moog, 2018).

Строительство Красноярской ГЭС привело к резкому изменению гидробиологических и гидрохимических характеристик нижнего бьефа р. Енисей. Образовался незамерзающий зимой участок протяженностью более 260 км, кроме этого летние температуры воды на данном участке не превышает 12 градусов. Эти изменения привели к экологической перестройке сообществ многих гидробионтов, в частности к образованию новых популяций, не свойственных естественной ихтиофауне р. Енисей (Беркович и др., 2003).

В связи с такими резкими гидрологическими изменениями стало необходимым проводить ихтиологические исследования, направленные на изучение сообществ гидробионтов, особенно интересны виды со сложной

пространственной организацией популяции, популяционные ареалы которых включают основной водоток и его придаточную сеть. Так, например, в последнее время появляется всё больше исследований структуры популяции местных хариусов. Хариус является ценной промысловой рыбой. В среднем течении р. Енисей, на участке от Красноярской ГЭС до устья р. Ангара хариус является одним из доминантных видов. Выявления пространственной структуры популяции хариуса в условиях нарушенного гидрологического режима способствует пониманию процессов микроэволюции и более эффективному управлению его запасов (Зиновьев, 2005).

Некоторые исследования показывают, что скорость роста популяции сибирского хариуса из среднего течения р. Енисей отличается от популяций, обитающих в притоках. Одним из факторов влияющим на эти различия является разный температурный режим в основном течении и притоках (Иванова и др., 2015).

Но как правило такие исследования проводят на небольшом участке среднего течения р. Енисей (около 50 км.), предполагая, что в главном течении на всём незамерзающем участке обитает только одна популяция хариусов. Однако, из-за множества гидрологических факторов, возникших после строительства ГЭС, в главном течении ниже плотины можно ожидать иной характер распределения популяций. В настоящее время остаётся неизвестным, можно ли полученные данные на одной из точек среднего течения р. Енисей от Красноярской ГЭС до устья р. Ангара экстраполировать на весь участок.

Цель работы – оценить однородность популяции байкальского хариуса *Thymallus baicalensis* Dybowski, 1874 из среднего течения р. Енисей.

Задачи:

1. Изучить степень дифференциации байкальского хариуса из трёх участков среднего течения р. Енисей по скорости роста.
2. Изучить степень дифференциации байкальского хариуса из трёх участков среднего течения р. Енисей по морфологии отолитов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эффекты зарегулирования, оказывающие влияние на гидробионтов

Изменение режима течения рек, вызванное зарегулированием, часто считается наиболее серьезной и постоянной угрозой экологической устойчивости речных экосистем. После создания плотины в верхнем бьефе образуется водохранилище. Создание крупных водохранилищ приводит к подъему грунтовых вод, усилению гидроморфизма почв, их заболачиванию, анаэробнозису, всплыванию торфяных залежей на заболоченных землях и к ухудшению экологических условий в водоемах и на прилегающих к ним территориях в целом. В нижнем бьефе изменения кажутся не такими очевидными, но они всё же присутствуют (Poff et al., 2010; Schmutz and Moog, 2018).

1.1.1 Изменения в верхнем бьефе

Плотины относятся к числу наиболее разрушительных видов деятельности человека в речных бассейнах. Водоохранилища могут быть очень похожи на естественные озера, однако своеобразная форма резервуара, его расположение и режим работы плотины может значительно изменить их физико-химический характер. Вода в водохранилище претерпевает большие изменения на ранних стадиях его формирования, пока не установится новый экологический баланс. После этого водохранилища могут перейти в своего рода стабильность, но режим работы плотины, сбросы воды или другие воздействия могут создать новые нарушения в системе (Schmutz and Moog, 2018).

Водоохранилища не только влияют на затопляемые участки реки, но также блокируют миграцию рыбы вверх и вниз по течению, а также на перенос

материала осадочных пород по реке. Сила такого влияния на экосистему сильно коррелирует с расположением плотины, размером водохранилища и временем пребывания воды. Продолжительность времени, в течение которого вода остается в пределах водохранилища (время пребывания воды), является одним из ключевых параметров, контролирующими биогеохимические параметры системы (Schmutz and Moog, 2018).

Процесс строительства плотин на реках настолько радикальный, что приводит к созданию совершенно новой экосистемы. В зависимости от размера и формы водохранилища, продольный гидрологический градиент может делиться от плотины на непроточную или озёрную зону и речную зону (в верховьях), между ними присутствует промежуточная зона. В небольших водохранилищах большую часть занимает речная зона, например, на русловых гидроэлектростанциях, в крупных водохранилищах преобладает озёрная часть (Qicai, 2011).

Вскоре после заполнения водохранилища термическая и химическая стратификации в водной толще постепенно усиливаются, и может произойти эвтрофикация из-за поступления питательных веществ из верхнего течения и разложения затопленных органических веществ. Водоохранилища гораздо более подвержены эвтрофикации, чем реки, так как проточные воды обладают более высокой способностью к самоочищению. Следовательно, качество воды в водохранилищах может ухудшиться, особенно вблизи дна. Все эти процессы изменяют всю пищевую цепочку (Ligon et al., 1995; Qicai, 2011).

В результате новая экосистема заселяется теми видами, которые населяли исходную реку и способны адаптироваться к новым условиям. Немигрирующие эвритопные виды преобладают в озёрной зоне водохранилища. Мигрирующие и реофильные виды в водохранилище сокращаются из-за утраты важнейших местообитаний (например, нерестилищ на участках рек со свободным течением). Следовательно, лимнобионтные виды рыб вытесняют другие виды и доминируют в сообществах водохранилищ. Реофилы обитают в средах, которые сохраняют

первоначальные речные характеристики – это участки выше по течению и притоки. Таким образом биологическое разнообразие уменьшается в направлении плотин (Ligon et al., 1995; Qicai, 2011; Schmutz and Moog, 2018).

Загрязнение дна водохранилища влияет на донные сообщества организмов, уменьшая их разнообразие. В результате преобладают, например, всего несколько видов хирономид. Как следствие, экологическое состояние водохранилищ, в пределах озёрной части, часто классифицируется как плохое (Schmutz and Moog, 2018).

1.1.2 Изменения в нижнем бьефе

Несмотря на то, что изменения в экосистеме нижнего бьефа менее изучены, влияние зарегулирования рек ниже по течению в равной степени или даже более разрушительны для водной фауны, учитывая, что водохранилища влияют в первую очередь на динамику потока воды. Водоохранилища перераспределяют сток реки, влияя на несколько гидрологических характеристик и, следовательно, на структуру, динамику и функционирование экосистем, расположенных ниже по течению. Помимо регулирования потока, за строительством плотины неизбежно следуют и другие важные изменения, такие как блокирование путей миграции некоторых видов рыб и задержка питательных веществ, идущих из верхнего течения. Последнее явление накладывает ограничения на биологическую продуктивность в районах ниже по течению (Cushman, 1985; Schmutz and Moog, 2018).

Особенно сильно негативные факторы зарегулирования выражены в пойменной части реки. Структура и функционирование таких экосистем зависят от сезонных чередований наводнения и засухи. Такое характерное чередование исчезает с образованием плотины, так как плотины обычно уменьшают естественный ток воды и стабилизируют его с помощью сбросов (отсутствие сезонных чередований) или наоборот увеличивают сбросы воды.

Следовательно, гидрологическая связь между средами значительно изменяется в пространстве и времени (Bunn, 2002).

Такое перераспределение режима затопления имеет несколько прямых и косвенных последствий для популяций рыб. Уменьшение сообщения между руслом реки и её поймы влияет на прибрежные сообщества животных, а также изменяет другие среды, которые обеспечивают важные места обитания для рыб, особенно для их молоди. В отсутствие наводнений, даже если взрослые особи успешно размножаются в притоках, икра, личинки и молодь рыбы, дрейфующие вниз по течению, имеют ограниченный доступ к поймам, что отрицательно сказывается на их выживаемости и в следствие на пополнении популяций (Bunn, 2002; Schmutz and Moog, 2018).

Если непрерывность переноса осадочного материала прерывается плотинами или, например, удаляется из канала путем добычи гравия, поток может стать истощенным, в связи с этим русла и берега реки становятся подвержены эрозии, вызывая врезку канала (выемка вниз), а также теряется среда обитания для литофильных видов. Врезка русла реки снижает возможность соединения с местообитаниями поймы. Вместе с уменьшением паводковых потоков размер и качество пойменных местообитаний уменьшаются, что влияет на продуктивность всей системы река-пойма. Кроме того, ниже по течению отсутствие осадочного материала может вызвать деградацию среды обитания из-за эрозии речных дельт или прибрежных берегов (Qicai, 2011).

Участки ниже по течению также подвергаются и другим воздействиям, связанным с работой плотины и качеством сбрасываемой воды. Работа гидроэлектростанций, как правило, соответствует потребностям в электроэнергии, создавая переменные режимы потока. Такие нерегулярные сбросы, усиливают эрозионные процессы ниже по течению и могут вызывать выброс на мель рыб и макробеспозвоночных (Angus et al., 2013).

Сброс некачественной воды турбинами и водосбросами ниже по течению также создает неблагоприятные условия, например, бескислородную

гиполимническую воду и резкие изменение температуры воды, что также сказывается на качестве жизни гидробионтов. Например, ниже плотин Синаньцзян и Даньцзянкоу в Китае нерест рыб задерживается на 20–60 дней из-за более низкой температуры воды (Zhong and Power, 1996).

Кроме того, сильный проливной поток на высоких плотинах может вызвать перенасыщение воды кислородом, вызывая у рыб газовую эмболию (Schmutz and Moog, 2018).

1.2 Обзор методов идентификации скоплений рыб

Необходимость идентифицировать отдельную рыбу или группу рыб привела к разработке огромного количества тегов или меток (искусственные объекты, прикрепляемые к рыбе) и марок (естественные маркеры). Условно все теги или метки можно разделить на внешние (внешне прикрепляются к рыбе, как правило хорошо заметны без специального оборудования) и внутренние (обычно не видны снаружи и для их обнаружения необходимо специальное оборудование, в некоторых случаях внутренними метками можно пометить большое количество рыб на раннем этапе жизни) (Coyle, 1998; Begg and Waldman, 1999).

Маркировка рыб может применяться для изучения запасов рыб, миграционных путей, оценки численности и эффективности производства инкубаториев или экспериментальных программ. Также маркировку используют для идентификации рыб разных видов и популяций (Begg and Waldman, 1999).

Анализ структуры популяции вида имеет первостепенное значение для разработки оптимальной стратегии эффективного управления им. Многие организации используют только видовой подход к управлению, который не учитывает вариации внутри вида. Такие подходы иногда могут оказаться безуспешными, поскольку у половых организмов скрещивание происходит именно внутри популяции, а не вида в целом (Begg and Friedland, 1999).

Искусственные метки чаще всего применяются для идентификации диких и искусственно выращенных рыб, для оценки эффективности программ по выращиванию и выпуску рыб (Thorsteinsson, 2002).

Естественные маркеры применяют для идентификации скоплений рыб, например, для идентификации популяций или других таксономических единиц. Кроме того, естественные маркеры также можно применять для определения диких и искусственно выращенных рыб, особенно такие методы удобны при большом количестве выпускаемой молоди (Uglen, 2019).

1.2.1 Морфология

Морфология это раздел биологической дисциплины, который изучает внешнее (форму, структуру, цвет и т.д.) и внутреннее строение организма или его таксона в индивидуальном развитии (онтогенез) или историческом (филогенез).

Морфологические исследования в ихтиологии часто применяют в целях выделения популяций или других скоплений рыб в пределах их места обитания (Cadrin, 2000).

Задачи, которые выполняют с помощью морфологических исследований включают в себя следующие пункты: описание биологического разнообразия и систематизация организмов, а также описание механизмов различных физиологических процессов. В связи с этим морфологию можно разделить на описательную, функциональную и сравнительную (Reis and Pawson, 1999; Зиновьев, Мандрица, 2003).

Описательная морфология возникла на самых ранних этапах развития биологии. Цель описательной морфологии – это буквальное описание морфологической организации живого организма. В настоящее время описательная морфология широко применяется в практике биологического мониторинга (Правдин, 1966).

Сравнительная морфология изучает закономерности строения живых организмов путём сравнения их с другими систематическими группами, таким образом можно систематизировать изучаемые объекты. Кроме того, сравнение различных органов в связи с их функциями показывает приспособления изучаемых животных к условиям их существования как целостных систем, а также происхождение и эволюционные пути организмов (Вышегородцев, Зуев, 2013).

Несмотря на новые методы систематики животных, например, молекулярно-генетические методы, классический морфологический анализ занимает большую часть систематики. Большинство научных работ в ихтиологии, в которых используется сравнительная морфология, посвящены систематике (Cadrin, 2013).

Функциональная морфология изучает структуры биологических объектов неразрывно от их функций. Результаты функциональной морфологии могут быть использованы крайне широко, в адаптационном аспекте, эволюционном и т.д (Вышегородцев, Зуев, 2013).

Комплексные морфологические исследования как правило включают в себя описательную и сравнительную части морфологии.

Прежде всего, необходимо отметить, что в ихтиологии морфологическое описание рыбы дается по её левой стороне, исключения бывают лишь в особых случаях, например, явная асимметрия некоторых рыб (камбалообразные) (Зиновьев, Мандрица, 2003).

Морфологическое описание рыб делают с помощью определённого набора признаков. Под признаком понимают какую-либо особенность организма или его таксона, которую можно изучить и выразить в количественных единицах. В ихтиологических исследованиях признаки делят на счетные (меристические), измеряемые (пластические) и альтернативные (качественные) (Яблоков, 1980).

Меристические признаки слабо зависят от размера изучаемой особи или её половой принадлежности, они являются более консервативными чем

пластические и качественные. В морфологических исследованиях чаще всего изучают следующие меристические признаки (Зиновьев, Мандрица, 2003):

- количество костных лучей в непарных и парных плавниках;
- количество жаберных тычинок;
- количество прободенных чешуй в боковой линии;
- общее количество позвонков и в различных отделах;
- количество пилорических придатков;
- количество мышечных сегментов;
- количество каналов сейсмодатчика системы;
- количество глоточных зубов.

Пластические признаки обладают значительной изменчивостью, которая вызвана влиянием факторов внешней и внутренней среды. В связи с этим пластические признаки можно использовать для описания особенностей индивидуального развития организма. Существует множество различных схем для описания пластических признаков, которые могут быть изменены в связи с особенностями изучаемого таксона рыб. Наиболее часто описывают следующие признаки (Зиновьев, Мандрица, 2003):

- измерения головы (длина головы и рыла, диаметра глаза, посторбитальное расстояние, высота и ширина головы);
- длина тела (полная, по Смигу, промысловая);
- антедорсальное расстояние;
- антеанальное расстояние
- антевентральное расстояние
- антепекторальное расстояние
- постдорсальное расстояние
- постанальное расстояние
- пектровентральное расстояние
- пектроанальное расстояние
- вентроанальное расстояние

- максимальная высота и ширина тела
- минимальная высота и ширина тела
- длины и высоты плавников
- длина основания спинного и анального плавников

Состояние качественных признаков невозможно измерить количественными методами, это такие признаки как окраска, характер ветвления лучей плавников, форма костей и т.д. При описании качественных признаков прибегают к оценке частоты их проявления. Например, В.И. Романовым и О.Г. Кармановой при изучении хариусов Сибири выделили 17 вариантов ветвления последнего спинного плавника, этим вариантам дали буквенные обозначения латинского алфавита от а до s (Романов, Карманова, 2007).

1.2.2 Геометрическая морфология

По определению И.Я. Павлинова геометрическая морфология – это выявление морфологических различий (форма) между изучаемыми организмами без учета их «размерного фактора» (Павлинов, 2002).

Геометрическая морфология представляет собой совершенно иной подход к анализу. В классической морфологии анализируются промеры признаков или их совокупность, а геометрическая морфология основана на многомерном анализе координат (x; y) точек (меток), расставленных в соответствии с определенными правилами на поверхности изучаемого объекта (Rohlf, 1998).

Форму можно рассматривать как точки в многомерном пространстве. Расстояния между точками в этом пространстве инвариантны к изменению местоположения, ориентации и масштаба системы координат, в которой оцифровываются образцы (Rohlf, 1998).

Дальнейшие сложные геометрические преобразования с метками позволяют перейти к иной метрике, в рамках которой и происходит сравнение объектов (Павлинов, 2002).

1.2.3 Генетическая изменчивость

Генетические различия между особями и популяциями являются основой для определения степени репродуктивной изоляции, которая является фундаментальным механизмом, структурирующим различия между этими таксономическими группами. Сила генетических изменений между популяциями положительно связана со временем, прошедшим с момента расхождения популяций и степенью их изоляции. Таким образом, если новая популяция только начинает образовываться, то это не приведет в видимым генетическим изменениям (Coyle, 1998).

Эффективность генетического анализа зависит от выбранного метода. Генетические методы, используемые при идентификации скоплений рыб, включают: аллозимный, митохондриальный и ядерный анализ ДНК (Begg, Friedland, 1999).

Основным принципом всех молекулярно-генетических методов является использование унаследованных стабильных маркеров для идентификации генотипов, характеризующих популяции. Полученные данные используются для проверки того, взяты ли образцы рыб из одной популяции с равновесными частотами генотипов или из совокупности генетически различных единиц (Begg, Friedland, 1999).

1.2.3.1 Аллозимный электрофорез

Генетические данные собираются быстрее всего с помощью аллозимного анализа, но аллозимы демонстрируют меньшую вариабельность, чем неэкспрессированные части генома, и на них может влиять отбор. Вполне

возможна ситуация, когда строки электрофоретически неразличимы, но организмы по-разному адаптировались к окружающей среде. Следовательно, вариация аллозимов является достаточным, но не необходимым условием для генетической дифференциации двух групп, и для полной картины необходимо использовать другие методы. Исследования невыраженных элементов ДНК обычно выявляют больше вариаций, но технически более сложны. Во многих случаях может оказаться целесообразным начать исследование аллозимов и, если этого окажется недостаточно, применить другие методы анализа ДНК (Utter 1995; Coyle, 1998). Например, атлантического большеголова (*Hoplostethus atlanticus*) нельзя было различить с помощью аллозимного электрофореза, однако анализ мтДНК на основе четырех рестриктаз показал значительную дифференциацию (Smolenski et al. 1993).

1.2.3.2 Анализ митохондриальной ДНК

Обычно считается, что анализ митохондриальной ДНК более эффективен, чем анализ аллозимов, для выявления структуры популяции. Это в значительной степени связано с тем, что мтДНК гаплоидна и наследуется по материнской линии: поэтому эффективный размер популяции в данном случае пропорционален числу размножающихся самок, в то время как для ядерного генома этот показатель равен удвоенному числу всех размножающихся особей в популяции (поскольку каждая особь содержит две копии ядерного генома). Уменьшенный эффективный размер популяции приводит к более быстрому отбору линий генов мтДНК внутри популяций, что усиливает эффекты генетического дрейфа.

В эволюционном плане она развивается на порядок быстрее, чем ядерная ДНК, несмотря на то что, темпы эволюции пойкилотермных животных могут быть снижены. Анализ мтДНК можно проводить на свежих, замороженных или хранящихся в спирте тканях (Coyle, 1998).

Первоначальные исследования основывались на очищенной мтДНК, полученной с помощью ультрацентрифугирования, в последнее время методы ПЦР ускорили анализ. Размеры образцов теперь могут приближаться к тем, которые используются в исследованиях аллозимов, хотя необходимое время все еще значительно больше. Существенные недостатки заключаются в том, что мтДНК обычно анализирует один признак, тогда как аллозимный электрофорез позволяет исследовать множество независимых признаков (локусов), а у некоторых видов, особенно морских рыб, в популяциях часто доминируют один или два гаплотипа мтДНК вместе со многими редкими вариантами (Cadrin, 2013).

1.2.3.3 Анализ ядерной ДНК

В отличие от митохондриальной ДНК, ядерная диплоидна; рекомбинация отражает генетические характеристики обоих полов. Также считается, что ядерная ДНК эволюционирует значительно медленнее, чем митохондриальная, но некоторые некодирующие маркеры, такие как минисателлиты и микросателлиты, могут развиваться быстрее, чем мтДНК. Из минусов можно отметить, что интерпретация данных ядерной ДНК может быть затруднена полиплоидией, как это часто бывает у осетровых и лососевых (Begg and Waldman, 1999).

В настоящее время генетические исследования уже не такие дорогостоящие как раньше, существуют коммерческие службы, которые разработают новые маркеры практически для любых видов, а также другие компании и университеты, которые будут извлекать ДНК из образцов тканей и отправлять обратно полный набор данных в течение нескольких недель за разумную плату. Один из популярных маркеров яДНК, который все чаще изучается, касается анализа повторяющихся последовательностей. Первоначально исследования были сосредоточены на минисателлитах. Минисателлиты представляют собой тандемные массивы коротких

олигонуклеотидных повторов (<65 пар оснований). Они рассредоточены по геному и обладают высокой степенью полиморфизма по количеству повторов (Coyle, 1998; Begg, Waldman 1999).

В отличие от минисателлитов, микросателлиты – повторяющиеся фрагменты ДНК длиной от 1 до 6 пар оснований, они с высокой частотой обнаруживаются в ядерных геномах большинства таксонов. Длина микросателлитного локуса обычно варьируется от 5 до 40 повторов, но возможны более длинные цепочки повторов. Динуклеотидные, тринуклеотидные и тетрануклеотидные повторы являются наиболее распространенным выбором для молекулярно-генетических исследований (Coyle, 1998; Selkoe, 2006).

Часть ДНК, окружающая микросателлитный локус, называется фланкирующей областью. Поскольку последовательности фланкирующих областей обычно консервативны у особей одного и того же вида, а иногда и у разных видов, конкретный микросателлитный локус часто можно идентифицировать по его фланкирующим последовательностям. В отличие от фланкирующих областей, последовательности микросателлитных повторов часто мутируют во время репликации ДНК, которые в первую очередь изменяют количество повторов и, следовательно, длину повторяющейся цепочки. Поскольку аллели различаются по длине, их можно отличить с помощью гель-электрофореза с высоким разрешением, который позволяет быстро генотипировать выборки по многим локусам (Selkoe, 2006).

1.2.4 Биохимический анализ

Биохимический состав различных популяций может отличаться, особенно если популяции разделены географически. Липидный состав тканей зависит от рациона рыб. Так, например, биохимический анализ используют для идентификации естественных и искусственно выращенных рыб, так как биохимический состав кормов, используемых при выращивании рыб,

отличается от естественного рациона (Uglen, 2019). На примере лососёвых была изучена возможность использования вариаций биохимического состава для различения диких и искусственно выращиваемых рыб с использованием нескольких методов, включая распределение жирных кислот (ЖК), химическое профилирование с элементным анализом и анализ ядерного магнитного резонанса углерода-13. Результаты показывают, что количественная оценка липидного состава и профилирование ЖК в большинстве случаев позволяют правильно различать искусственно выращиваемого и дикого лосося (Uglen, 2019).

1.2.4.1 Микрохимия отолитов

Отолиты – это парные слуховые косточки, воспринимающие механические раздражения и функционирующие как органы равновесия, впервые это отметил Reibisc в своём наблюдении 1899 года. Из исследования (Pannella, 1971) известно, что у многих костистых рыб приращения на отолитах происходит с 24-часовой периодичностью. Рост отолитов происходит за счет дифференциального осаждения карбоната кальция и белка в течение 24-часового периода. Кроме возраста по отолитам можно примерно вычислить размеры тела особей, так как размеры отолитов увеличиваются в течение всей жизни.

В последнее время большую популярность приобретают методы микрохимии отолитов. Химический состав отолитов варьируется в зависимости от факторов окружающей среды (например, от температуры, солёности, химии воды), но также может зависеть и от физиологии (например, скорости метаболизма). Таким образом, зная химический состав можно определить в каких условиях росла рыба. (Campana, 1999). Однако результаты этих методов часто трудно интерпретировать из-за комбинированного воздействия физиологического, онтогенетического и экологического влияний на отложение микроэлементов (Begg and Waldman, 1999).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дипломная работа была выполнена на кафедре водных и наземных экосистем Института фундаментальной биологии и биотехнологии СФУ. Работа включала в себя два этапа, первый это анализ изменчивости морфологии отолитов и второй – анализ изменчивости скорости роста.

2.1 Анализ изменчивости морфологии отолитов

Отбор проб и отолитов

Байкальский хариус *Thymallus baicalensis* Dybowski, 1874 был отловлен на трех станциях среднего течения р. Енисей (от Красноярской ГЭС до устья р. Ангара (рис. 1) в период между 2019 и 2020. Станции сбора находились в населённых пунктах ниже по течению ГЭС. Первая станция – п. Овсянка (20 км от ГЭС), вторая – п. Хлоптуново (130 км от ГЭС), третья – п. Галанино (280 км от ГЭС). Вся рыба была выловлена плавными сетями, диаметр ячеек 30-40 мм. Для каждой рыбы были измерены абсолютная длина (TL, мм), длина тела по Смитту (FL, мм), масса тела (W, г), определён пол. Далее были извлечены сагиттальные отолиты. Отолиты отчищали от каналов внутреннего уха, высушивали на воздухе и хранили в бумажных упаковках с индивидуальной этикеткой.

Количество рыб из каждой выборки составило: Галанино – 19 особей, Хлоптуново – 13, Овсянка – 15. Для анализа были использованы только левые отолиты без видимых повреждений (сколы, надломы, трещины, повреждения рострума и т.д.). В результате после отбора количество отолитов для анализа составило Галанино – 17 отолитов, Хлоптуново – 5, Овсянка – 11.

Цельные отолиты просматривали под бинокляром ЛОМО МСП- 1 в отраженном свете. Отолиты располагали вогнутой стороной вверх и ориентировали в положении рострумом влево. Изображение получали с помощью камеры ЛОМО IS300 в формате bmp.

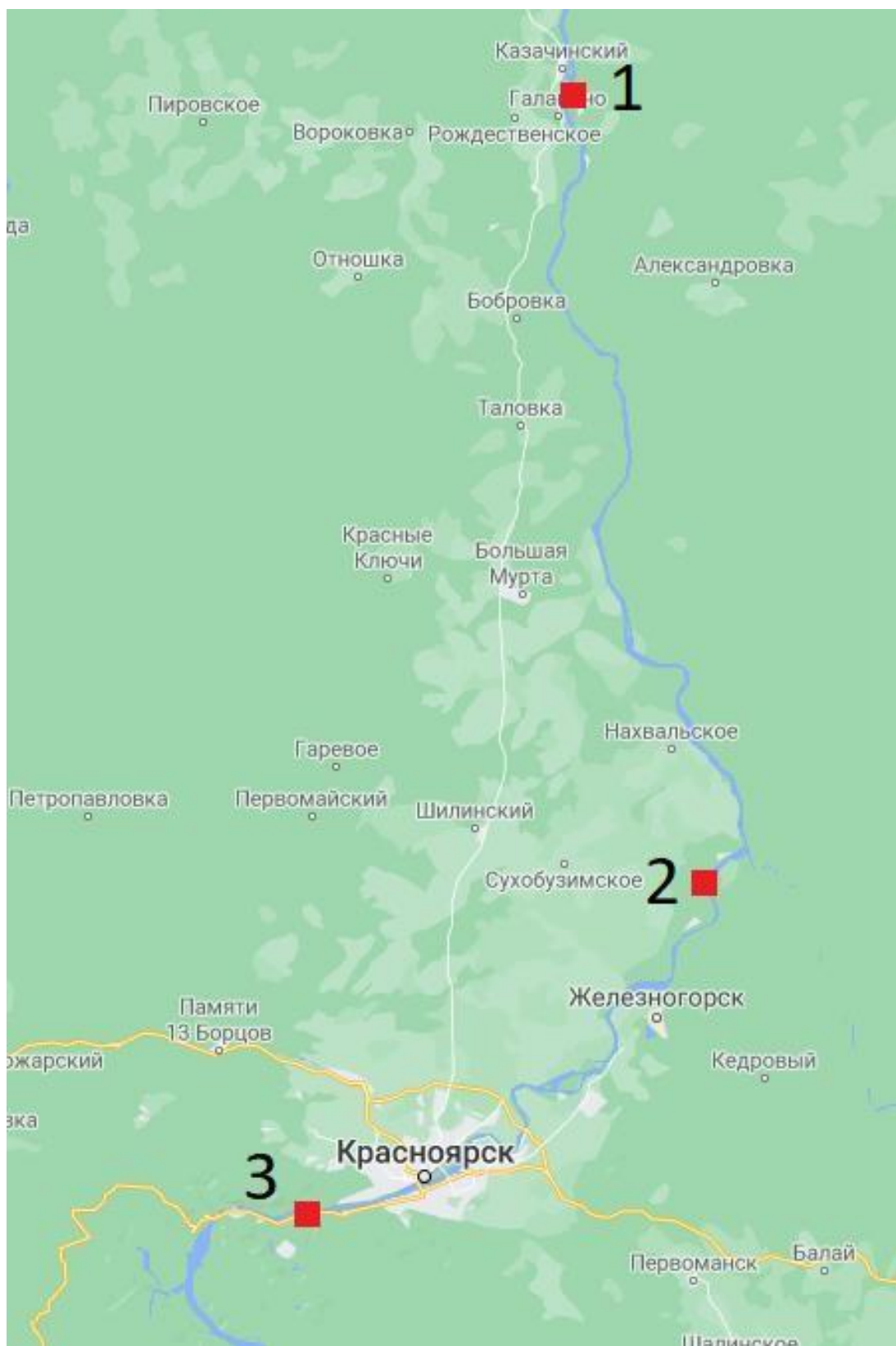


Рисунок 1 – Точки сбора ихтиологического материала

1 – п. Галанино, 2 – п. Хлоптуново, 3 – п. Овсянка

■ – места сбора проб

В связи с тем, что не все полученные изображения отолитов были достаточно контрастные для автоматического анализа, их аккуратно выделяли по контуру вручную в программе Photoshop.

Строение отолитов

Описание отолитов выполняли с использованием терминов и характеристик, принятых в литературе по данной тематике (рис. 2).

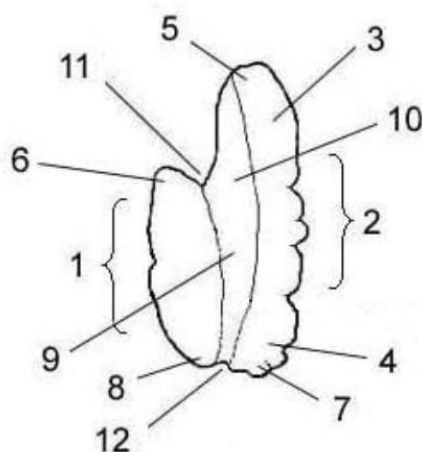


Рисунок 2 – Основные морфологические показатели для описания отолита. На внутренней поверхности (inside): 1 –дорсальная часть (dorsalpart); 2 –вентральная часть (ventralpart); 3 – передняя или оральная часть (anterior); 4 – задняя или каудальная часть (posterior); 5 – роострум (rostrum); 6 – антироострум (antirostrum); 7 – построострум (postrostrum); 8 – парароострум (parastrostrum); 9 – желобок (sulcus); 10 – остиум (ostium); 11 – большая выемка (bigexcision); 12 – малая выемка (smallexcision) (Светочева, Эриксен, 2013)

Анализ формы отолитов

Для интегрального анализа контуров отолитов использовали эллиптический анализ Фурье и пакет SHAPE1.3 (Iwata, Ukai, 2002). Этот анализ описывает контур, при этом он не зависит от ориентации, размера и начальной точки отсчёта исследуемого объекта.

Контур отолита описывается несколькими гармониками, каждая из которых характеризуется четырьмя коэффициентами (дескрипторами Фурье). Чем больше число гармоник, тем более точно описывается контур (Kuhl, Giardina, 1982).

Чтобы определить необходимое и достаточное число гармоник для анализа, для каждой гармоники оценивали вклад в описание контура отолита используя следующую формулу:

$$PF = \frac{A_n^2 + B_n^2 + C_n^2 + D_n^2}{2}, \quad (1)$$

где PF – Fourier power;

A_n, B_n, C_n, D_n – коэффициенты гармоники n .

Далее был рассчитан суммарный вклад гармоник по формуле:

$$PF_c = \sum_{n=1}^n PF_n, \quad (2)$$

где – PF_c – суммарный вклад гармоник.

Достаточное количество гармоник для анализа должно составлять 99,99% среднего суммарного вклада, таким образом реконструкция отолита составляет 99,99% (Lestrel, 1997). Полученное число гармоник составило – 9.

Три первых коэффициента первой гармоники для анализа не используются, поскольку они являются константами ($A_1 = 1, B_1 = C_1 = 0$) и представляют собой простой эллипс. Они используются для нормализации остальных гармоник. Таким образом, число коэффициентов, описывающих контур каждого отолита, составило – 33.

2.2 Анализ изменчивости скорости роста

Отбор проб

Для анализа изменчивости скорости роста было отобрано 75 особей байкальского хариуса, подробнее выборка описана в таблице 1.

Чешую для анализа отбирали всегда с одного участка – под спинным плавником, над боковой линией. Далее её высушивали на воздухе и помещали в чешуйные книжки.

Таблица 1 – Распределение выборки байкальского хариуса по возрастным группам, в шт.

Возраст, лет	Место отлова		
	п. Галанино	п. Хлоптуново	п. Овсянка
2+	1	14	8
3+	10	9	19
4+	4	3	7
Всего	15	26	34

Для анализа у каждой рыбы под бинокулярном ЛОМО МСП- 1 просматривали по 8-10 чешуй, после чего отбирали по 3 чешуи наиболее правильной формы. Из отобранных чешуй делали временные препараты. Изображение получали с помощью камеры ЛОМО IS300 в формате bmp в отраженном свете.

На каждой чешуе с помощью программы ImageJ измеряли максимальный передний диагональный радиус, а также радиус для каждого годового кольца (рис. 3).

Метод обратного расчисления размеров рыб

Методы обратного расчисления размеров рыб используют набор измерений, полученных на рыбе в момент поимки, и позволяет делать выводы о её длине в более раннее время. Эти методы предполагает, что рост рыбы и рост чешуи (или других регистрирующих структур) пропорциональны.

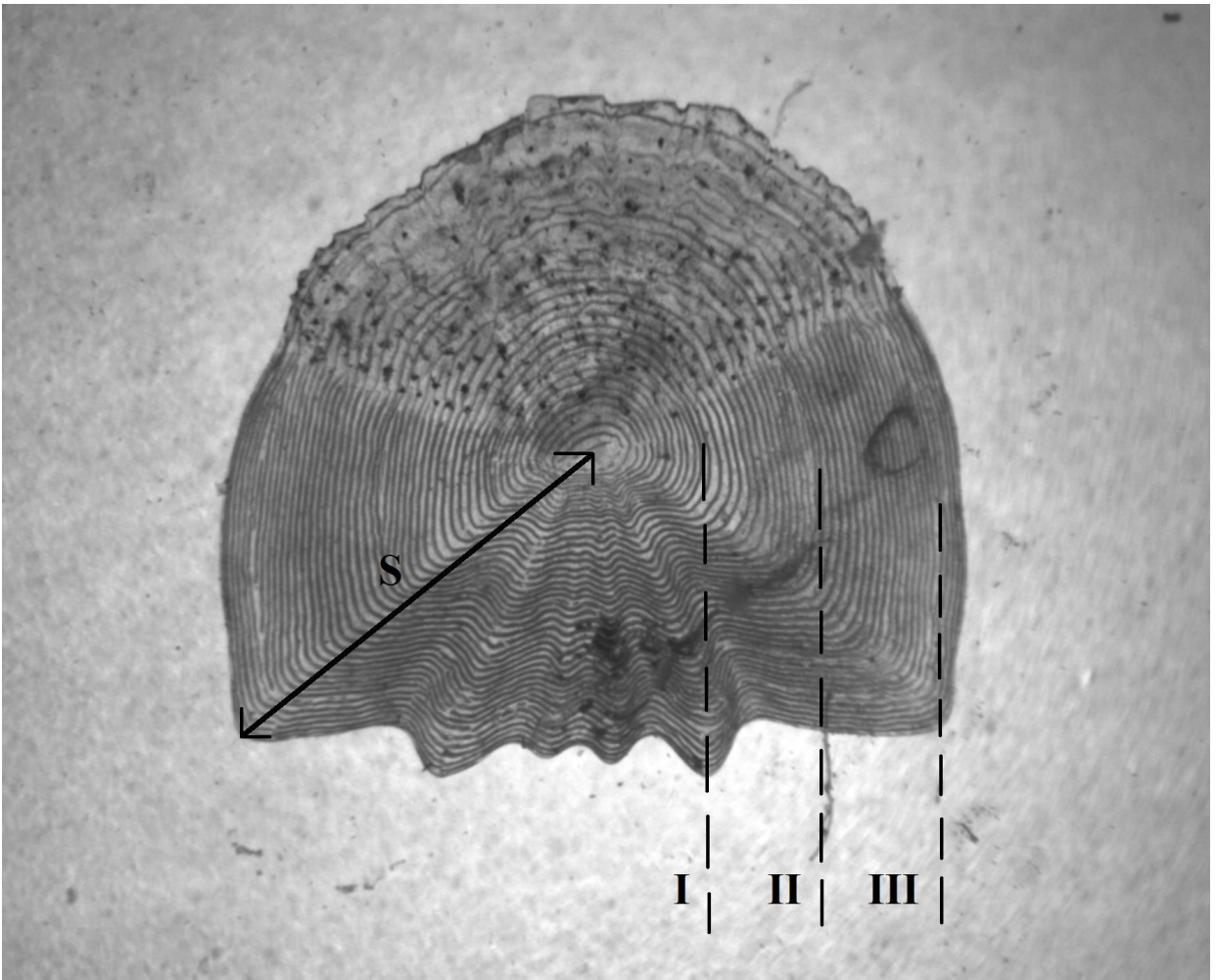


Рисунок 3 – Чешуя байкальского хариуса

S – передний диагональный радиус; I, II, III – годовые кольца

Наиболее распространены следующие модели обратного расчёта:

SPH (Scale-proportional hypothesis):

$$L_i = -\frac{a}{b} + (L_c + \frac{a}{b}) \frac{S_i}{S_c}, \quad (3)$$

BPH (Body-proportional hypothesis):

$$L_i = \frac{(c + dS_i)/(c + dS_c)}{L_c}, \quad (4)$$

Модель Fraser-Lee:

$$L_i = c + (L_c - c) \left(\frac{S_i}{S_c} \right)^a, \quad (5)$$

где L_i – длина рыбы в момент времени i ;

L_c – длина рыбы в момент поимки;

S_i – радиус чешуи в момент времени;

S_c – радиус чешуи в момент поимки;

a, b, c, d – коэффициенты полученные из регрессии.

Для получения коэффициентов проводят линейную регрессию S на L либо L на S , выбор регрессии зависит от метода, так, например, для метода SHP наиболее верна регрессия S на L , а для ВРН – L на S .

При выборе метода важно учитывать тип выборки. Методы отлова часто являются избирательными по отношению к размеру рыбы, самые мелкие и крупные рыбы редко попадают в выборку. Для выборок таких типов рекомендовано использовать регрессию S на L (Francis, 1990). Таким образом, для данной работы был выбран SHP метод.

Для статистической проверки результатов использовали тест ANCOVA в программе PAST.

ВЫВОДЫ

1. Скорость роста байкальского хариуса из трёх, географически удалённых участках, среднего течения р. Енисей не отличалась между собой (ANCOVA $p = 0,08$). Популяция байкальского хариуса из среднего течения р. Енисей по темпам роста является однородной.

2. Морфологический анализ отолитов показал наличие индивидуальной изменчивости формы отолитов внутри групп, однако достоверных различий между группами байкальского хариуса выявлено не было ($\lambda = 0,9981$).

Отсутствие различий между группами внутри популяции можно объяснить тем, что, не смотря на то что, географическое расстояние между группами достаточно велико, отсутствуют специфичные гидрологические условия, способствующие дифференциации формы отолитов.

3. Исходя из полученных данных можно сделать предположение, что на участке от Красноярской ГЭС до устья р. Ангара происходят миграции популяций, что в конечном итоге приводит к однородности выборки. Таким образом, результаты различных исследований, проводимых с хариусами на одной из точек участка среднего течения от Красноярской ГЭС до устья р. Ангара можно экстраполировать на весь участок.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Афанасьев П. К., Орлов А. М., Рольский А. Ю. Сравнительный анализ формы отолитов как инструмент видовой идентификации и изучения популяционной организации различных видов рыб //Зоологический журнал. – 2017. – Т. 96. – №. 2. – С. 192-200.
2. Беркович К. М., Виноградов Н. Н., Иванов В. В., Чалов Р. С. Переформирования русла Енисея ниже Красноярской ГЭС в условиях интенсивной техногенной нагрузки //Эрозия почв и русловые процессы. – 2003. – №. 14. – С. 144-161.
3. Вышегородцев А. А., Зуев И. В. Избранные главы ихтиологии [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие к лабораторным работам – Красноярск: Сиб. Федер. Ун-т, 2013. – 40 с.
4. Зиновьев Е. А. Экология и систематика хариусовых рыб Евразии: Дис. ... д-к биол. Наук: 20.12.05 / Зиновьев Евгений Александрович – Пермский государственный университет, 2005. – 75 с.
5. Зиновьев Е. А., Мандрица С. А. Методы исследования пресноводных рыб: учеб. пособие по спец курсу / Е. А. Зиновьев. – Пермь: Пермский университет. – 2003. – 113 с.
6. Иванова Е. В., Оськина Н. А., Зуев И. В. Показатели роста и плодовитости сибирского хариуса *Thymallus arcticus* (Pallas, 1776) в среднем течении реки Енисей //Вопросы рыболовства. – 2015. – Т. 16. – №. 1. – С. 87- 95.
7. Михеев П. Б. и др. Биологические особенности нижеамурского хариуса *Thymallus tugarinae* (Salmoniformes: Thymallidae). 2. Рост //Вопросы ихтиологии. – 2012. – Т. 52. – №. 6. – С. 689-689.
8. Павлинов И. Я., Микешина Н. Г. Принципы и методы геометрической морфометрии //Журнал общей биологии. – 2002. – Т. 63. – №. 6. – С. 473-493.

9. Павлов Д. А. Дифференциация трёх видов рода *Ureneus* (Mullidae) по форме отоликов // Вопросы ихтиологии. – 2016. – Т. 56. – №. 1. – С. 41-55.
10. Правдин И. Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных): Монография: М.: Изд-во «Пищевая промышленность» – 1966. – 267 с.
11. Просекин К. А., Просекина А. А. К вопросу о стратегии сосуществования байкалоленского и черного байкальского хариуса в условиях симпатрии (Джержинский заповедник) // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2009. – Т. 18. – №. 3. – С. 161-164.
12. Романов В. И., Карманова О. Г. О таксономическом статусе монгольского хариуса из озера Хиндиктиг-Холь и сибирского хариуса из бассейна реки Кобдо // Биологические аспекты рационального использования и охраны водоемов Сибири. – 2007. – С. 218-233.
13. Светочева О. Н., Эриксен Е. Морфологическая характеристика отоликов некоторых донных рыб Баренцева моря // Вестник Кольского научного центра РАН. – 2013. – №. 4 (15).
14. Яблоков А. В. Фенетика: эволюция, популяция, признак. – Наука, 1980.
15. Angus Webb J. et al. Squeezing the most out of existing literature: a systematic re- analysis of published evidence on ecological responses to altered flows // Freshwater Biology. – 2013. – Т. 58. – №. 12. – С. 2439-2451.
16. Anoshko P. N. et al. Morphological differentiation of the otoliths of graylings from the Barguzin River and Lake Baikal // Limnology and Freshwater Biology. – 2020. – С. 382-386.
17. Begg G. A., Friedland K. D., Pearce J. B. Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview // Fisheries research. – 1999. – Т. 43. – №. 1-3. – С. 1-8.
18. Begg G. A., Waldman J. R. An holistic approach to fish stock identification // Fisheries research. – 1999. – Т. 43. – №. 1-3. – С. 35-44.

19. Bunn S. E., Arthington A. H. Basic principles and ecological consequences of altered flow regimes for aquatic biodiversity //Environmental management. – 2002. – T. 30. – №. 4. – C. 492-507.
20. Cadrin S. X. Advances in morphometric identification of fishery stocks //Reviews in Fish biology and Fisheries. – 2000. – T. 10. – №. 1. – C. 91-112.
21. Cadrin S. X., Kerr L. A., Mariani S. (ed.). Stock identification methods: applications in fishery science. – 2013.
22. Campana S. E., Gagné J. A., McLaren J. W. Elemental fingerprinting of fish otoliths using ID-ICPMS //Marine Ecology Progress Series. – 1995. – T. 122. – C. 115-120.
23. Campana, S. E. 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. Marine ecology progress series. 188: 263 – 297.
24. Coyle T. Stock identification and fisheries management: the importance of using several methods in a stock identification study //Taking stock: defining and managing shared resources'. (Ed. DA Hancock.) pp. – 1998. – C. 173-182.
25. Cushman R. M. Review of ecological effects of rapidly varying flows downstream from hydroelectric facilities //North American journal of fisheries Management. – 1985. – T. 5. – №. 3A. – C. 330-339.
26. Ding L. et al. Hydrogeomorphic factors drive differences in otolith morphology in fish from the Nu- Salween River //Ecology of Freshwater Fish. – 2019. – T. 28. – №. 1. – C. 132-140.
27. Francis R. Back- calculation of fish length: a critical review //Journal of Fish Biology. – 1990. – T. 36. – №. 6. – C. 883-902.
28. Hammer O. et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis //Palaeontologia electronica. – 2001. – T. 4. – №. 1. – C. 9.
29. Iwata H., Ukai Y. SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors //Journal of Heredity. – 2002. – T. 93. – №. 5. – C. 384-385.

30. Kuhl F. P., Giardina C. R. Elliptic Fourier features of a closed contour //Computer graphics and image processing. – 1982. – T. 18. – №. 3. – C. 236-258.
31. Lestrel P. E. (ed.). Fourier descriptors and their applications in biology. – Cambridge University Press, 1997.
32. Ligon F. K., Dietrich W. E., Trush W. J. Downstream ecological effects of dams //BioScience. – 1995. – T. 45. – №. 3. – C. 183-192.
33. Lychakov D. V., Rebane Y. T. Effect of otolith shape on directional sound perception in fishes // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 1992. – T. 28. – C. 531-531.
34. Pannella, G. 1971. Fish Otoliths: Daily Growth Layers and Periodical Patterns. Science, 173(4002), 1124–1127.
35. Poff N. L., Zimmerman J. K. H. Ecological responses to altered flow regimes: a literature review to inform the science and management of environmental flows //Freshwater biology. – 2010. – T. 55. – №. 1. – C. 194-205.
36. Qicai L. Influence of dams on river ecosystem and its countermeasures //Journal of Water Resource and Protection. – 2011. – T. 2011.
37. Reis E. G., Pawson M. G. Fish morphology and estimating selectivity by gillnets //Fisheries Research. – 1999. – T. 39. – №. 3. – C. 263-273.
38. Reist J. D. An empirical evaluation of several univariate methods that adjust for size variation in morphometric data //Canadian Journal of Zoology. – 1985. – T. 63. – №. 6. – C. 1429-1439.
39. Rohlf F. J. On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny //Systematic Biology. – 1998. – T. 47. – №. 1. – C. 147-158.
40. Schmutz S., Moog O. Dams: ecological impacts and management //Riverine ecosystem management. – Springer, Cham, 2018. – C. 111-127.
41. Selkoe K. A., Toonen R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers //Ecology letters. – 2006. – T. 9. – №. 5. – C. 615-629.

42. Smolenski A. J., Ovenden J. R., White R. W. G. Evidence of stock separation in southern hemisphere orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*, Trachichthyidae) from restriction-enzyme analysis of mitochondrial DNA //Marine Biology. – 1993. – T. 116. – №. 2. – C. 219-230.
43. Tracey S. R., Lyle J. M., Duhamel G. Application of elliptical Fourier analysis of otolith form as a tool for stock identification //Fisheries Research. – 2006. – T. 77. – №. 2. – C. 138-147.
44. Uglem I. et al. Evaluation of large- scale marking methods in farmed salmonids for tracing purposes: Impact on fish welfare //Reviews in Aquaculture. – 2020. – T. 12. – №. 2. – C. 600-625.
45. Utter, E M. (1995). Perspectives of molecular genetics and fisheries into the 21st century. In "Molecular Genetics in Fisheries". (Eds. G. R. Cavalho and T. J. Pitcher) pp. 105-10. Chapman and Hall: Melbourne.
46. Zhong Y., Power G. Environmental impacts of hydroelectric projects on fish resources in China //Regulated Rivers: Research & Management. – 1996. – T. 12. – №. 1. – C. 81-98.

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

Кафедра водных и наземных экосистем
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия

« ____ » ____ 20 ____ г

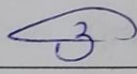
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Степень дифференциации байкальского хариуса из
среднего течения реки Енисей по скорости роста и
морфологии отолитов

Тема

Руководитель



подпись, дата


доцент, к.б.н

должность, ученая степень

И. В. Зуев

инициалы, фамилия

Выпускник

28.06.21. 

подпись, дата

Л. А. Парыгина

инициалы, фамилия

Красноярск, 2021