

УДК 597.556.33:575(265.53)

КАРИОТИП БЕЛЬДЮГИ ФЕДОРОВА *ZOARCES FEDOROVII* (*ZOARCIDAE, PISCES*) ИЗ ТАУЙСКОЙ ГУБЫ ОХОТСКОГО МОРЯ

И. Н. Рязанова, С. В. Фролов

Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток
E-mail: sfrolov@ibm.dvo.ru

Исследован кариотип бельдюги Федорова *Zoarces fedorovi* Chereshev, Nazarkin et Chegodaeva, 2007 (сем. *Zoarcidae*) из Тауйской губы Охотского моря: $2n = 48$ (4 мета-, 6 субмета-, 34 субтело- и 4 акроцентрические хромосомы), $NF = 58$. Изменчивости по числу хромосом и различий между кариотипами самцов и самок не обнаружено. С использованием метода Ag-NOR-окрашивания выявлены ядрышкообразующие районы (ЯОР) в теломерных участках длинных плеч двух субтелоцентрических хромосом разного размера. Отмечена изменчивость ЯОР в виде разного числа ЯОР-несущих хромосом в клетках и числа окрашиваемых блоков ЯОР в хромосомах. Кариотипы *Z. fedorovi* и европейской бельдюги *Z. viviparus* сходны по числу и морфологии хромосом, но различаются по выделяемым в них числам СТ и А хромосом, что объяснимо их наличием на разных стадиях метафазы. Наиболее выражены различия кариотипов этих видов по числу и локализации ЯОР.

Ключевые слова: бельдюга, *Zoarces fedorovi*, Охотское море, кариотип.

Бельдюги рода *Zoarces* (семейство *Zoarcidae* – бельдюговые) распространены в северо-восточной и северо-западной Атлантике, а также в Желтом, Японском и Охотском морях. Род включает 5 видов, 2 из которых (европейская *Z. viviparus* и американская *Z. americanus* бельдюги) являются атлантическими, а 3 – северотихоокеанскими приазиатскими видами (восточная бельдюга *Z. elongatus*, бельдюга Гилла *Z. gillii* и бельдюга Андрияшева *Z. andriashevi*), обитающими в Охотском, Японском и Желтом морях (Черешнев, Chegodaeva, 2006; Черешнев и др., 2007; Anderson, 1994).

На севере Охотского моря род *Zoarces* долгое время считался представленным 1 видом – восточной бельдюгой *Z. elongatus* (Федоров и др., 2003). Но недавно там была обнаружена новая форма бельдюги – *Zoarces* sp., которая по морфологическим признакам отличается от других видов тихоокеанских бельдюг (*Z. elongatus*, *Z. gillii* и *Z. andriashevi*) меньшими значениями счетных признаков, пропорциями тела, головы и плавников. Эта бельдюга характеризуется также наличием в передней части спинного плавника крупного четкого овального черного пятна, свойственного тихоокеанским *Z. gillii* и *Z. andriashevi* (Черешнев, Chegodaeva, 2006; Парин и др., 2005). Сходство *Zoarces* sp. с тихоокеанской *Z. elongatus* и атлантическими *Z. viviparus* и *Z. americanus* бельдюгами заключается в отсутствии контакта меж-

ду внутренними краями теменных костей черепа (Черешнев, Chegodaeva, 2006; Черешнев и др., 2007; Anderson, 1994). Морфологические исследования показали, что новая форма бельдюги не может быть отнесена ни к одному из известных видов рода *Zoarces* и представляет собой самостоятельный вид, недавно описанный как бельдюга Федорова *Zoarces fedorovi* Chereshev, Nazarkin et Chegodaeva, 2007 (Черешнев и др., 2007). На основании генетических исследований (анализ нуклеотидных последовательностей гена *COI* мтДНК) были показаны существенные отличия *Z. fedorovi* от европейской *Z. viviparus* и восточной *Z. elongatus* бельдюг, но при этом генетически *Z. fedorovi* оказался ближе к *Z. viviparus*, чем к *Z. elongatus* (Радченко и др., 2008), хотя морфологически два последние вида более сходны друг с другом, чем каждый из них с *Z. fedorovi* (Черешнев, Chegodaeva, 2006; Черешнев и др., 2007).

Кариотипы большинства видов рода *Zoarces* ранее изучены не были, за исключением кариотипа европейской бельдюги *Z. viviparus* Белого и Балтийского морей ($2n = 48$, $NF = 56$) (Klinkhard, 1991). Представляется, что комплексное применение современных методов морфологии, молекулярной генетики и кариологии при исследовании новой формы *Z. fedorovi*, а также других видов рода *Zoarces* позволит разрешить вопросы происхождения, родственных связей, филогенетических отношений и последовательности эволюционных изменений видов данного рода. Цель настоящей работы – описание кариотипа новой

формы бельдюги *Z. fedorovi* и сравнение его с кариотипом европейской бельдюги *Z. viviparus* для выяснения степени их кариологической дифференциации и уточнения их родственных отношений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследованы кариотипы 6 экз. новой формы бельдюги *Z. fedorovi* (5 самок и 1 самец), выловленных в зал. Одян Тайской губы Охотского моря в устье р. Кулькиты. Рыб отлавливали среди камней во время отливов. Видовую принадлежность устанавливали по морфологическим признакам (Черешнев и др., 2007).

Материалом для работы послужили препараты, приготовленные по методу воздушного высушивания из суспензии клеток предпочки (Фролов, 1989). Предварительно рыбам сразу после поимки делали внутримышечную инъекцию 0,5%-ного раствора колхицина (1 мл на 1 кг массы тела) и выдерживали в крабовых ловушках в морской воде в течение 6 ч. Затем рыб забивали, из небольших кусочков предпочки с помощью шприца готовили суспензию клеток в 0,5%-ном растворе хлористого калия. После оседания крупных кусков ткани суспензию переносили в центрифужные пробирки и выдерживали при комнатной температуре в течение 25 мин для гипотонической обработки клеток, после чего клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а осадок фиксировали, не разбивая, свежей охлажденной смесью этанола и ледяной уксусной кислоты (3:1) в течение 45 мин, сменяя фиксатор через каждые 15 мин. В последней порции фиксатора осадок разбивали и полученную суспензию наносили по каплям на охлажденные влажные предметные стекла. Препараты высушивали над спиртовкой. Хромосомы окрашивали рутинно 4%-ным раствором красителя Giemsa (Sigma) в дистиллированной воде и анализировали их качество под микроскопом, после чего готовили серии препаратов для их подробного анализа и дифференциального окрашивания хромосом.

Для выявления ядрышкообразующих районов хромосом применяли метод Ag-NOR-окрашивания (Howell, Black, 1980). На препарат капали смесь 50%-ного раствора азотнокислого серебра и 2%-ного раствора желатина с муравьиной кислотой, после чего накрывали его покровными стеклами и помещали во влажную камеру (чашку Петри) при температуре 60°C на 15 мин. Время обработки подбирали экспериментальным путем. В случае осаждения гранул серебра на стекло препарат помещали на 5 мин в 5%-ный раствор гипосульфита натрия для их отмывки.

Использована общепринятая классификация хромосом (Levan et al., 1964). Метацентрические

(М) и субметацентрические (СМ) хромосомы считали двуплечими, субтелоцентрические (СТ) (с очень коротким вторым плечом) и акроцентрические (А) хромосомы (с невидимым вторым плечом) относили к одноплечим. В сравнительном плане проанализирован кариотип европейской бельдюги *Z. viviparus* (Klinkhard, 1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ

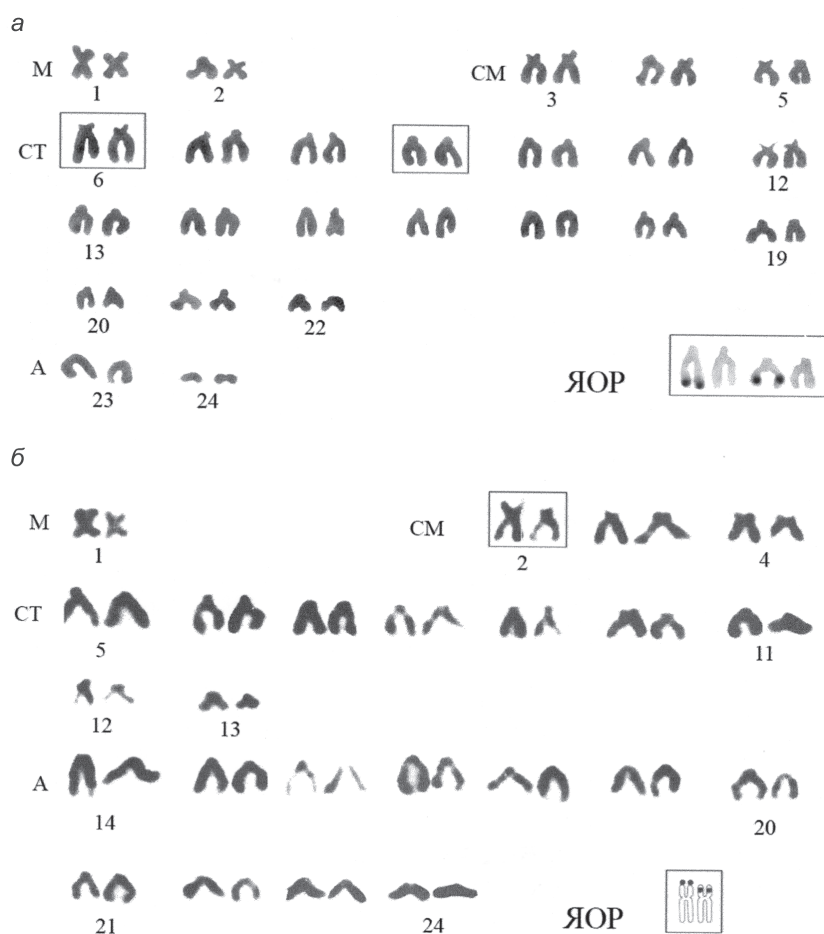
Описание кариотипа составлено по результатам анализа 229 рутинно окрашенных метафазных пластинок (см. таблицу). Кариотип всех рыб содержал 48 хромосом, число хромосомных плеч $NF = 58$ (см. рисунок, а). Среди них 4 М хромосомы (см. рисунок а, 1-я, 2-я пары). М хромосомы первой пары во всех исследованных кариотипах различаются между собой по величине. Первая М хромосома крупнее второй, что отчетливо выявляется на всех метафазных пластинках. Вторая пара М хромосом по размерам приблизительно равна СМ хромосомам 5-й пары. 6 СМ хромосом (3–5-я пары) примерно одинаковы по размеру, выделены в отдельный ряд хромосом. 34 СТ хромосомы (6–22-я пары) с хорошо выраженными короткими плечами располагаются в порядке убывания их размеров. Завершают ряд одноплечих хромосом 4 А хромосомы (23-я, 24-я пары). Изменчивости по числу хромосом не обнаружено, различия между кариотипами самок и самца не выявлены. На препаратах встречались клетки и с меньшим числом хромосом (фрагменты метафазных пластинок), что объясняется методическими погрешностями при приготовлении препаратов.

Проанализированы 73 метафазные пластинки, окрашенные азотнокислым серебром. Ядрышкообразующие районы (ЯОР) выявлены в теломерных участках длинных плеч двух СТ хромосом разных размеров (см. рисунок, а). Одна из них по размерам соответствует 1-й паре СТ хромосом (6-я пара на рисунке, а), вторая – СТ хромосомам 4-й пары (9-я пара на рисунке, а). Наблюдалась изменчивость числа ЯОР в виде разного количества

Число хромосом в клетках предпочки *Z. fedorovi* The number of chromosomes in the head kidney cells of *Z. fedorovi*

Номер и пол особи	Число клеток		Всего клеток
	2n < 48	2n = 48	
1 ♂	9	89	98
2 ♀	8	38	46
3 ♀	2	31	33
4 ♀	–	29	29
5 ♀	1	6	7
6 ♀	1	15	16
Всего клеток	21	208	229

Примечание. Прочерк – отсутствие клеток.



Кариограммы и ЯОР-несущие хромосомы *Z. fedorovi*, $2n = 48$, $NF = 56$ (a), и европейской бельдюги *Z. viviparus*, $2n = 48$, $NF = 56$ (б, по: Klinkhard, 1991, модифицировано). М – мета-, СМ – субмета-, СТ – субтело-, А – акроцентрические хромосомы; ЯОР-несущие хромосомы приведены в рамках. Ув. 10×100

The karyograms and NOR-bearing chromosomes of *Z. fedorovi*, $2n = 48$, $NF = 56$ (a), and the European eelpout *Z. viviparus*, $2n = 48$, $NF = 56$ (b, in: Klinkhard, 1991, modified). М – meta-, СМ – submeta-, СТ – subtelo-, А – acrocentric chromosomes; NOR-bearing chromosomes are in frames. Enlargement 10×100

(одна или две) ЯОР-несущих хромосом в клетке, а также изменчивости количества блоков (одиночные, двойные, а у двух из 6 исследованных рыб – тройные) ЯОР в хромосоме.

ОБСУЖДЕНИЕ

Кариотипы *Z. fedorovi* ($2n = 48$, $NF = 58$) и *Z. viviparus* ($2n = 48$, $NF = 56$) сходны по числу и морфологии хромосом (см. рисунок). Первая пара М хромосом *Z. fedorovi* идентична паре М хромосом в кариотипе *Z. viviparus* (см. рисунок, 1-е пары в кариограммах). В кариотипах обоих видов эти М хромосомы различаются размерами: первая из них несколько крупнее второй. Мы выделяем в кариотипе *Z. fedorovi* вторую пару М хромосом. В своей работе М. Б. Клинкард (Klinkhard, 1991) выделяет лишь одну пару М хромосом в кариотипе *Z. viviparus* и, соответственно,

определяет число хромосомных плеч в нем $NF = 56$. Однако в представленной им кариограмме *Z. viviparus* 12-я пара хромосом (СТ в его трактовке – см. рисунок, б) по относительным размерам к 1-й паре М и соотношению длин плеч сходна со 2-й парой М, выделяемой нами в кариотипе *Z. fedorovi* (см. рисунок, а). С учетом этого мы рассматриваем кариотипы обоих видов как имеющие две пары М хромосом, а число хромосомных плеч у обоих $NF = 58$. СМ хромосомы в кариотипах *Z. fedorovi* и *Z. viviparus* (см. рисунок, а, 3–5-е пары; б, 2–4-е пары) представлены тремя парами хромосом, примерно одинаковых по размеру у обоих видов.

Ряды одноплечих хромосом в кариотипах данных видов состоят из 19 пар СТ и А хромосом, различие заключается лишь в их количественном соотношении. У *Z. fedorovi* 17 пар СТ хромосом и 2 пары А хромосом (см. рисунок, а, 6–24-е пары), у *Z. viviparus* – 8 пар СТ хромосом и 11 пар А хромосом (см. рисунок, б, 5–24-е пары, за исключением 12-й пары, которую мы считаем М). Данное различие в относительном числе СТ и А хромосом может быть следствием разной выраженности коротких плеч СТ хромосом, обусловленной разной степенью спирализации хромосом в представленных кариотипах. Также отмечено, что дифференциация

между СТ и А хромосомами в кариотипе *Z. viviparus* является проблематичной, так как короткие плечи очень малы (Klinkhard, 1991). Поэтому автор считает более удобным сгруппировать одноплечие хромосомы в общий ряд СТ-А хромосом (sta), а кариотип представлять в виде $2n = 2m + 6sm + 40sta$. В исследованном нами кариотипе *Z. fedorovi* короткие плечи СТ хромосом выражены достаточно отчетливо, что позволяет выделить их в отдельный ряд.

Кариотипы *Z. fedorovi* и *Z. viviparus* различаются по локализации активных ядрышкообразующих районов и по морфологии несущих их хромосом. В кариотипе *Z. viviparus* ЯОР расположены в коротких плечах первой пары СМ хромосом. В одной из них ЯОР выявляются в теломерном районе, в другой – в прителомерном (см. рисунок, б, вставка). При этом в зависимости от локализа-

ции ЯОР (теломерная или прителомерная) размеры коротких плеч хромосом этой пары различаются даже при рутинном окрашивании хромосом (см. рисунок, б, 2-я пара хромосом). В отличие от *Z. viviparus* в кариотипе *Z. fedorovi* ЯОР выявлены в теломерных/прителомерных районах длинных плеч СТ хромосом разных пар, различающихся размерами (см. рисунок, а, вставка). Различаются кариотипы данных видов и по числу окрашиваемых блоков ЯОР: согласно иллюстрации (Klinkhard, 1991), в кариотипе *Z. viviparus* ЯОР одиночные, тогда как в кариотипе *Z. fedorovi* они могут проявляться в виде одиночных, двойных и тройных блоков.

Изменчивость ядрышкообразующих районов в пределах видов одного рода (имеющих сходные или идентичные по количеству хромосом и хромосомных плеч кариотипы), которая выражается в варьировании их количества и локализации в хромосомах разной морфологии, широко распространена у рыб других таксонов, в частности – у лососевых (Salmonidae). В зависимости от характера изменчивости ЯОР (число ЯОР-несущих хромосом, число активных ЯОР-блоков в хромосоме) они рассматриваются в качестве дифференцирующего или интегрирующего виды, формы и популяции маркера, удобного в популяционных, систематических и филогенетических исследованиях (Фролов, 2000).

Таким образом, сравнение кариотипов *Z. fedorovi* и *Z. viviparus* показало их значительное сходство (если не идентичность) по числу и морфологии хромосом. По-видимому, идентичны и числа хромосомных плеч в кариотипах этих видов, а их различие (в имеющихся описаниях кариотипов) можно объяснить разной трактовкой морфологии одной из пар М/СТ хромосом. Кариотипы двух видов бельдюг различаются по выделяемым в них числам СТ и А хромосом, что, возможно, является следствием их изучения на разных стадиях метафазы. Самые значительные отличия кариотипов *Z. fedorovi* и *Z. viviparus* заключаются в числе и локализации ЯОР. Этот признак кариотипа – наиболее существенный и позволяет надежно различать данные виды.

Значительное сходство общей структуры кариотипов *Z. fedorovi* и *Z. viviparus* указывает на родство этих видов, а их значительная дифференциация по числу и локализации ЯОР – на принадлежность, вероятно, к достаточно давно разошедшимся филогенетическим линиям бельдюг. Поэтому необходимо исследование кариотипов других видов рода *Zoarces* (прежде всего охотоморских, представленных наибольшим числом видов), что внесет свой вклад в понимание их

родственных связей и филогенетических отношений.

Авторы выражают искреннюю благодарность чл.-корр. РАН И. А. Черешневу (г. Магадан, ИБПС ДВО РАН) за помощь в определении видовой принадлежности рыб, к. б. н. М. Ю. Засыпкину (г. Магадан, ИБПС ДВО РАН) за организацию технической стороны работы, зав. лабораторией искусственного воспроизводства лососей и аквакультуры Б. П. Сафроненкову и всему коллективу этой лаборатории (г. Магадан, МагаданНИРО) за помощь в сборе материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке администрации ИБМ им. А. В. Жирмунского ДВО РАН и гранта ДВО РАН (07-III-Д-06-056).

ЛИТЕРАТУРА

- Парин Н. В., Григорьев С. С., Кармовская Э. С. *Z. andriashevi* (Zoarcidae) – новый вид бельдюги из вод юго-западной Камчатки // Вопр. ихтиологии. – 2005. – Т. 45, № 4. – С. 437–440.
- Радченко О. А., Черешнев А. И., Петровская А. В. и др. Изменчивость нуклеотидных последовательностей гена *COI* мтДНК у некоторых видов бельдюг рода *Zoarces* (Zoarcidae, Pisces) // Генетика. – 2008. – (В печати).
- Федоров В. В., Черешнев И. А., Назаркин М. В. и др. Каталог морских и пресноводных рыб северной части Охотского моря. – Владивосток: Дальнаука, 2003. – 204 с.
- Фролов С. В. Дифференциация половых хромосом у лососевых рыб. 1. Кариотип и половые хромосомы микижи *Parasalmo mykiss* // Цитология. – 1989. – Т. 31, № 11. – С. 1391–1394.
- Фролов С. В. Изменчивость и эволюция кариотипов лососевых рыб. – Владивосток: Дальнаука, 2000. – 227 с.
- Черешнев И. А., Чегодаева Е. А. О размножении живорождением и некоторых особенностях биологии бельдюги *Zoarces* sp. (Zoarcidae, Pisces) из Тайской губы Охотского моря // Вестник СВНЦ ДВО РАН. – 2006. – № 3 (7). – С. 54–64.
- Черешнев И. А., Назаркин М. В., Чегодаева Е. А. *Zoarces fedorovi* sp. nova (Perciformes: Zoarcidae) – новый вид бельдюги из Тайской губы Охотского моря // Вопр. ихтиологии. – 2007. – Т. 47, № 5. – С. 589–600.
- Anderson M. E. Systematics and osteology of the Zoarcidae (Teleostei: Perciformes) // Ichthyol. Bull. J. L. Smith. Inst. Ichthyol. – 1994. – No. 60. – 120 p.
- Howell W. M., Black D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // Experientia. – 1980. – Vol. 36. – P. 1014–1015.
- Klinkhard M. B. Comparison of the karyology (C-banding, Ag-NOR) of eelpout (*Zoarces viviparus*) from the White Sea and the Baltic Sea // Cytobios. – 1991. – No. 68. – P. 29–36.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // Hereditas. – 1964. – Vol. 52. – P. 201–220.

**THE KARYOTYPE OF *ZOARCES FEDOROV* (ZOARCIDAE, PISCES)
EELPOUT FROM THE TAU BAY, THE SEA OF OKHOTSK**

I. N. Ryazanova, S. V. Frolov

A new *Zoarces fedorovi* (Zoarcidae) eelpout karyotype is examined (Chereshnev, Nazarkin and Chegodaeva, 2007), the Tau Bay of the Sea of Okhotsk. The obtained data are as follows: $2n = 48$ (4 meta-, 6 subme-, 34 subtelo-, and 4 acrocentric chromosomes), and $NF = 58$. Not a chromosome number variability or male/female karyotype differences are found. The nuclear-forming areas (NOR) are identified, by virtue of Ag-NOR banding technique, in long arm telomers of two subtelocentric chromosomes from different pairs. The NOR variability expresses itself in a different number of NOR-bearing chromosomes in cells and the number of NOR-staining blocks in chromosomes. The karyotypes of *Z. fedorovi* and the European eelpout *Z. viviparus* are similar by their chromosome numbers and morphology ($2n = 48$, $NF = 56$), but differ by their meta-, subtelo- and acrocentric chromosome numbers, which can be due to their studies at different metaphase stages. The differences between these species karyotypes are the most significant in their NOR numbers and areas.

Key words: eelpout, *Zoarces fedorovi*, the Sea of Okhotsk, karyotype.