

МИНИСТЕРСТВО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА СССР  
ВСЕСОЮЗНЫЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОРСКОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА И ОКЕАНОГРАФИИ  
(ВНИРО)

На правах рукописи  
УДК 597.442 - III.II

СУББОТКИН

Михаил Фёдорович

АНТИГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ ОСЕТРОВЫХ  
РОДА **ACIPENSER**

03.00.10 - ихтиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 1991



Работа выполнена в лаборатории экологической биохимии водных животных Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина АН СССР.

Научный руководитель – заслуженный деятель науки РСФСР,  
доктор биологических наук, профессор  
В.И. Лукьяненко

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
М.И. Шатуновский  
доктор медицинских наук  
А.А. Терентьев

Ведущее учреждение – кафедра ихтиологии Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Защита диссертации состоится " 6 " XVI 1991 г.  
в \_\_\_\_\_ часов на заседании Специализированного совета Д 117.01.02 при Всесоюзном ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательском институте морского рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО). 107140, Москва, ул. В. Красносельская, д. 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИРО

Автореферат разослан " \_\_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 1991 г.

Ученый секретарь  
Специализированного совета  
кандидат биологических наук Астафьева – А.В. Астафьева

- I -

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблемы сохранения и рационального использования запасов экономически ценных видов рыб потребовали от ихтиологов поиска и внедрения новых методических подходов для решения вопросов внутривидовой и межвидовой дифференциации. Обстоятельные исследования, выполненные на лососевых, осетровых, сельдевых и многих других традиционных объектах промысла, показали высокую эффективность иммунологических методов анализа эритроцитарных антигенов, а также антигенов сывороточных белков (de Ligny, 1969; Лукьяненко, 1971; O'Rourke, 1974; Кирпичников, 1987).

Особая роль отводится иммунологическим методам в изучении вопросов биохимической систематики. Чрезвычайно интересными в этом плане являются осетровые – эволюционно древняя группа рыб, представленная высоко полиморфными видами и разнообразными экологическими формами, имеющая важное хозяйственное значение. Накопленные материалы по биохимии, генетике, экологии в совокупности с данными по морфологии, свидетельствуют о глубоких различиях отдельных видов осетровых. На основании кариологических данных, изучения гибридов естественного происхождения, а также опытов по скрещиванию, предлагается закрыть род *Huso* и объединить осетровых в роду *Acipenser* (Николюкин, 1966; Бурцев, Николюкин, Серебрякова, 1973; Серебрякова, 1975; Арефьев, 1988) или возвести в ранг родов две группы малохромосомных и многохромосомных видов (Васильев, 1985).

С другой точки зрения, основанной на электрофоретическом анализе гемоглобина, белков сыворотки и икры, предлагается объединить стерлядь и шипа с белугой и калугой в роду *Huso*, севрюгу выделить в самостоятельный род *Helops*, а в роду *Acipenser* оставить



собственно осетров (Гераскин, 1978; Лукьяненко, 1979, 1986; Лукьяненко, Гераскин, 1979).

Для успешного решения поднятой проблемы необходимы всесторонние исследования представителей рода *Acipenser*, составной частью которых является иммунохимический анализ их сывороточных белков.

Восстановление численности стерляди до промышленных масштабов в условиях зарегулирования основной "стерляжьей" реки Волги, потребовало проведения инвентаризации имеющихся запасов, включая популяционно-генетические исследования.

Особого внимания заслуживает сибирский осетр как перспективный объект товарного осетроводства. Отсутствие единой точки зрения на внутривидовую структуру и филогенетические связи сибирского осетра из различных водоемов ставят перед необходимостью дальнейшего изучения этого вида.

Цель работы. Методами иммунохимического анализа провести сравнительное изучение антигенов сывороточных белков осетровых рода *Acipenser*. Основное внимание сосредоточить на следующих вопросах:

1. Антигенные спектры сывороточных белков различных популяций стерляди и сибирского осетра.
2. Иммуно-генетический анализ популяционной структуры стерляди бассейна реки Волги.
3. Иммунохимический анализ внутривидовой дифференциации сибирского осетра рек Оби, Енисея и Лены.
4. Видовые особенности антигенов сывороточных белков осетровых рода *Acipenser*.

Научная новизна работы. Вскрыт характер изменчивости антигенов сывороточных белков представителей рода *Acipenser* на внутривидовом и межвидовом уровнях. Установлено, что различия внутривидовых группировок обусловлены неодинаковым количеством белка, приходящегося на иммунохимически сходные компоненты. Качественные отличия по специфическим антигенам обычно выражены слабо. Получены новые доказательства генетической самостоятельности шести популяций стерляди реки Волги и её притоков Оки и Камы, а также экологических рас - туводной и полупроходной. У сибирского осетра обнаружен принципиально иной характер внутривидовых особенностей, проявляющийся в резких отличиях антигенов сывороточных белков рыб из Енисея. Показаны видоспецифические черты иммуноэлектрофореграмм сывороточных белков представителей рода *Acipenser*. Выделены три типа иммуноэлектрофореграмм: "осетровый", "шипный" и "севрюжий". На межвидовом уровне значительно возрастает роль специфических антигенов, что проявляется в увеличении их количества и доли приходящегося на них белка. Отдельные видоспецифические антигены удается обнаружить в опытах с нормальными антисыворотками. Для каждого вида характерно наличие одного или нескольких специфических антигенов, которыми он отличается от всех остальных видов. Обнаружено высокое сходство двух видов осетров: русского и сибирского, при этом сибирский осетр Оби и русский осетр Волги являются наиболее близкими группировками. Установлена связь желтого пигмента сыворотки крови русского осетра с видоспецифическим антигеном зоны альфа<sub>1</sub>-глобулинов. Полученные результаты подтверждают обоснованность выделения стерляди, шипа и севрюги из рода *Acipenser*. Стерлядь, шипа и севрюгу, по видимому, следует рассматривать как представителей самостоятельных родов.



Практическое значение. Видоспецифичность иммуноэлектрофорграмм сывороточных белков, специфические антигены видов и популяций позволяют использовать полученные данные для решения спорных вопросов систематики осетровых. Обнаруженные внутривидовые различия стерляди по специфическим антигенам могут быть использованы в качестве критериев для контроля популяционной структуры этого вида в бассейне Волги. Связь желтого пигмента сыворотки крови с антигенными особенностями русского осетра дает возможность применения этого биохимического маркера для анализа и направленного отбора производителей русского и персидского осетров на рыбодобывающих заводах Каспийского бассейна и четкой дифференциации этих видов на местах нагула. Иммунохимические особенности сывороточных белков стерляди и сибирского осетра могут быть использованы для дифференцировки этих видов и выявления их гибридов в бассейне Енисея.

Апробация. Материалы диссертации представлялись на V, VI, VII Всесоюзных конференциях по экологической физиологии и биохимии рыб (Севастополь, 1982; Вильнюс, 1985; Ярославль, 1989), III Всесоюзном совещании по генетике, селекции и гибридизации рыб (Тарту, 1986), IX совещании по эволюционной физиологии (Ленинград, 1986), первом симпозиуме по экологической биохимии рыб (Ярославль, 1987), отчетной сессии ЦНИИ осетрового хозяйства (Астрахань, 1983).

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 214 страницах машинописного текста, иллюстрирована 18 таблицами и 17 рисунками; состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций и приложения. Список литературы включает 185 названий, в том числе 55 иностранных.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходным материалом служила сыворотка крови осетровых (табл. I). Из индивидуальных сывороток готовили пулы, включая самцов независимо от стадии зрелости, а самок только I и II стадий. Сборные сыворотки консервировали борной кислотой и хранили при +4°C.

Антисыворотки получали от кроликов, руководствуясь известными рекомендациями (Людоговская, 1968; Чард, 1981). Использовали антисыворотки после II-IV реиммунизаций от 2-4 кроликов на каждый вид или популяцию. Кровь у кроликов отбирали прижизненно из краевой вены уха по 40-50 мл за один прием.

Для выявления специфических антигенов проводили абсорбцию антисывороток. Затем методом спиртового осаждения из них выделяли гамма-глобулиновую фракцию (Храмкова, 1968) и одновременно концентрировали в 4 раза.

Двойную диффузию ставили в 1% агаре "Дифко" (США) или 1.5% агар-агаре "Реанал" (ВНР), приготовленном на 0.9% растворе NaCl, руководствуясь рекомендациями по микрометоду (Гусев, 1968). Основным штампом служил вариант "семерка" с диаметром лунок и расстоянием между ними 4 мм.

Имуноэлектрофорез проводили в соответствии с руководством для системы "Мультифор" фирмы ЛКБ (Швеция) (Wallenborg, Andersson, 1978). Использовали 1% гель агарозы "Н" слоем толщиной 1.5 мм на трис-барбитуратном буфере pH 8.6 ионной силой 0.02. Консервированные сыворотки перед анализом диализировали против кветного буфера и выравнивали по белку до концентрации 35 мг/мл. Электрофорез проводили в модифицированной нами камере прибора ПЭФ-3, снабженной охлаждающей плитой, благодаря чему поддерживался температурный режим +11-13°C. Продолжительность электрофо-



Таблица I  
Состав, сроки и места сбора материала.

Объект исследования	Водоём	Район сбора	Время: :сбора: :мате- :риала: : (год)	Кол-во индивидуаль-ных сы-вороток : (шт)
<b>СТЕРЛЯДЬ *</b>				
верхневолжская	р. Волга	пос. Работки	1980	72
		пос. Заволжье	1983	42
		пос. Заволжье	1985	59
средневолжская	р. Волга	пос. Ташевка - Красновидово	1980	55
			1981	76
нижневолжская	р. Волга	г. Волгоград	1981	28
		г. Волгоград	1983	50
		г. Волгоград	1984	34
дельтовая	р. Волга	с. Ямное	1981	49
		т. "Чкаловская"	1983	14
окская	р. Ока	пос. Жайск	1982	110
		пос. Жайск	1985	66
камская	р. Кама	с. Гольяны - р. Белая	1983	88
РУССКИЙ ОСЕТР	р. Волга	т. "Чкаловская"	1979	38
		г. Волгоград	1984	40
ПЕРСИДСКИЙ ОСЕТР	Каспийское море	Юго-восточная часть, о. Огурчинский	1981	21
СИБИРСКИЙ ОСЕТР	р. Лена	устье р. Натара	1979	29
		устье р. Натара	1982	41
		пос. Сумароково	1981	38
	р. Енисей	г. Салехард	1983	32
ШИП	р. Урал	т. "Нижедамбинская"	1980	32
		т. "Еркенкалинская"	1984	55
СЕВРЮГА	р. Волга	т. "Чкаловская"	1979	49
		г. Волгоград	1984	33

\* Популяционная структура стерляди по В.И. Лукьяненко (1987).

реза при напряжении 10 в/см составляла около 45 или 75 мин, в зависимости от условий опыта.

Иммунодиффузия длилась 2.5 суток. На заключительном этапе препараты окрашивали на белки амидочерным IO Б и высушивали (Штраубе, Клауш, Хофман, 1979).

При расшифровке иммуноэлектрофореграмм учитывали число полос преципитации, их локализацию, форму и интенсивность (Грабар, Буртен, 1963).

Сходство иммуноэлектрофоретических спектров определяли по относительной величине перекрестных реакций по формуле:

$$\frac{Ab + Ba}{Aa + Bb}$$

где: Aa и Bb - число дуг преципитации в гомологичных реакциях; Ab и Ba -

число дуг преципитации в гетерологичных реакциях.

Различия по специфическим антигенам, выявленным после абсорбции антисывороток, оценивали в баллах. Для этого проводили определение титра антител в реакции двойной иммунодиффузии с двухкратным разведением антигена. Каждое последующее разведение приравнивалось к увеличению на 1 балл: исходная концентрация - 1 балл, разведение 1:2 - 2 балла, разведение 1:4 - 3 балла и так далее. В случае многокомпонентных систем, подсчитывали баллы для каждой полосы, а результаты суммировали.

#### ВНУТРИВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ АНТИГЕНОВ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ

I. Шесть популяций стерляди волжского бассейна.

Антигены сывороточных белков различных популяций стерляди иммуноэлектрофоретически дифференцируются на 26-30 компонентов в гомологичных реакциях и 22-28 - в гетерологичных. Большинство выявляемых антигенов имеют слабые или сильно варьирующие по интенсивности дуги преципитации. Лишь 2 компонента в зонах альбу-



минов и бета-глобулинов имеют мощные дуги преципитации. Ещё 3 основных антигена, относящиеся к альфа<sub>1</sub>-, альфа<sub>2</sub>- и бета-глобулинам, хотя и формируют менее интенсивные дуги, но проявляются стабильно, независимо от используемых антисывороток.

На примере популяций стерляди выявлено несколько вариантов изменчивости антигенных спектров:

1. В опытах с гетерологичными антисыворотками исчезают отдельные дуги преципитации, но при этом выявляются другие, аналогов которых нет в гомологичных реакциях.

2. Дуги преципитации некоторых антигенов варьируют по интенсивности в зависимости от популяционной принадлежности сывороток, от слабых до ярко выраженных.

3. Наличие определенной дуги преципитации обуславливает отсутствие другой и наоборот.

4. В отдельных популяциях выявляются компоненты, отличающиеся по локализации от основной массы.

Наиболее часто встречается первый вариант изменчивости. Наблюдаемые особенности, как правило, отражают количественные различия по белку, приходящемуся на иммунохимически сходные антигены у разных популяций стерляди.

Относительные величины перекрестных реакций, полученные по данным иммуноэлектрофоретического анализа, составляют 0.87-0.98 и свидетельствуют о высоком антигенном сходстве сывороточных белков шести популяций стерляди волжского бассейна.

Высокое антигенное сходство подтверждено и опытами по абсорбции антисывороток, когда в 15 сопоставлениях из 28 не выявлено различий. В остальных случаях установлено наличие специфических антигенов. Суммарно межпопуляционные различия проявляются по I-3

антигенам в I-3 балла, самые глубокие различия - в 7 баллов обнаружены между нижеволжской и дельтовой стерлядью.

Неоднородность волжской стерляди описана давно. Ярким примером является длина рыла. Короткорылость камской стерляди (Меньшиков, Букирев, 1934) послужила основанием для выделения её в *morpha kamensis* (Берг, 1948). По мнению других авторов длина рыла отражает внутривидовую дифференциацию на озимую и яровую расы (Шмидтов, 1939; Лукин, 1947).

Разнокачественность стерляди Волги и её притоков Оки и Камы показана по различным биохимическим показателям: сывороточным белкам (Лукьяненко и др., 1973; Гераскин, Федер, 1974; Баль, 1979; Кузьмин, Лукьяненко, 1987) и их неспецифическим эстеразам (Кузьмин, Лукьяненко, 1986), гемоглобину (Баль, 1979; Баль, Гераскин, 1979; Лукьяненко, 1984, 1987; Лукьяненко, Васильев, 1986) и другим.

Результаты иммунохимического анализа сывороточных белков расширяют представление о внутривидовой изменчивости стерляди. Наличие специфических антигенов, которыми шесть популяций стерляди волжского бассейна различаются между собой, свидетельствуют о иммуногенетической самостоятельности этих группировок.

Особый интерес представляет полупроходная дельтовая стерлядь. Она распространена на ограниченном участке дельты Волги и способна выходить на нагул в распресненные воды Каспия, доходя по западному побережью до Куры (Берг, 1934, 1948). Её молодь нагуливается в Северном Каспии на одних площадях с типичными проходными видами - осетром и севрюгой (Полянинова, 1971). Эта стерлядь обладает определенными физиологическими особенностями, дающими возможность переносить повышенную соленость (Лукьяненко, 1972; Лукьяненко, Металлов, 1973).



Наши исследования показали, что популяции туводной стерляди отличаются друг от друга, а также от дельтовой стерляди различными специфическими антигенами, тогда как дельтовая отличается от них одним и тем же альфа<sub>2</sub>-глобулином. Такие особенности дельтовой стерляди отражают иммуногенетическую природу отличий полупроходной расы от туводной.

## 2. Три популяции сибирского осетра.

Среди сибирского осетра различных водоемов наиболее гетерогенным является осетр из Енисея, у которого выявлено 29 антигенных компонентов. Ленский осетр, напротив, представлен минимальным количеством антигенов. Со всеми использованными антисыворотками у него не удастся выявить более 22 компонентов (табл. 2).

Анализ иммуноэлектрофоретических трех популяций сибирского осетра, полученных в опытах с гетерологическими антисыворотками на белки различных популяций и видов осетровых, позволил выявить все 4 варианта изменчивости, описанные на примере стерляди. Для сывороточных белков осетра из Оби характерна слабая вариабельность иммуноэлектрофоретических независимо от используемых антисывороток. Межпопуляционные различия сибирского осетра проявляются по количеству антигенов, а также иммуноэлектрофоретическим спектрам. Наиболее ярко это наблюдается при сравнении енисейской и ленской популяций. В то же время относительные величины перекрестных реакций, составляющие 0.87-0.94 свидетельствуют о высокой степени антигенного сходства сывороточных белков трех популяций сибирского осетра.

Изучение сывороточных белков двух видов осетровых методом иммуноэлектрофореза показало следующее. Для популяций сибирского осетра Оби, Енисея и Лены свойственно наличие ряда характер-

ных им в отдельности особенностей, тогда как иммуноэлектрофоретические шесть популяций стерляди представляют собой "вариации" вокруг определенного набора антигенов.

Неодинаковая степень внутривидовой антигенной дифференциации сибирского осетра обнаружена в опытах с абсорбированными антисыворотками. Осетр из Енисея отличается от осетра из Лены по трем антигенам, среди которых один альфа<sub>1</sub>-глобулин и один альфа<sub>2</sub>-глобулин. В свою очередь ленский осетр отличается от енисейского по двум антигенам. Один из них дает мощную дугу преципитации в зоне альбуминов. Суммарно эти различия проявляются по 5 антигенам и оцениваются в 17 баллов. Отличия осетра из Оби от осетров Енисея и Лены выражены слабее - суммарно 3 антигена и 8 баллов.

Таким образом, различия между обским и енисейским, обским и ленским осетрами, по специфическим антигенам, сопоставимы с межпопуляционными у стерляди, а между енисейским и ленским - значительно превосходят этот уровень.

Несмотря на длительное изучение сибирского осетра по морфологическим признакам, единой точки зрения в вопросе его внутривидовой дифференциации в настоящее время нет (Берг, 1911; Дрягин, 1933, 1948; Никольский, 1939; Меньшиков, 1947; Петкевич, Башмаков, Башмакова, 1950; Соколов, Кашин, 1965; и др.). Полученные последние биохимические данные, также свидетельствуют о глубоких отличиях рыб из различных водоемов по сывороточным белкам и гемоглобину (Баль, Карнауков, Гераскин, 1981; Гераскин и др., 1981; Кузьмин, Лукьяненко, 1982, 1984; Лукьяненко, Кузьмин, 1983; Лукьяненко, 1985, 1986; и др.). Наши результаты иммунохимического изучения антигенов сывороточных белков отражают резкие отличия енисейского осетра от ленского и обского. Одной из возможных причин этого



является естественная гибридизация енисейского осетра и сибирской стерляди, описанная ранее (Подлесный, 1955; Хохлова, 1955) и имеющая место, по-видимому, в настоящее время (Лукьяненко, 1984, 1986).

Родственные связи трех популяций сибирского осетра, основанные на антигенном сходстве их сывороточных белков, представляются следующим образом:

ленская → обская → енисейская

#### МЕЖВИДОВАЯ АНТИГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ

##### I. Группа собственно осетров.

Гетерогенность русского и персидского осетров, составляющая 22-23 антигенных компонента в гомологичных реакциях, сопоставима с таковой у сибирского осетра Лены и ниже, чем у осетров Оби и Енисея (табл. 2).

У каспийских как и сибирских осетров во всех зонах электрофоретической подвижности, за исключением гамма-глобулинов, отмечается образование более интенсивных дуг в опытах с гетерологичными антисыворотками, чем с гомологичными. При этом часто выявляются дополнительные компоненты, дуг которых нет с гомологичными антисыворотками. Эти результаты отражают глубокие количественные различия по белку, приходящемуся на иммунохимически сходные у разных видов антигены.

Наряду с имеющими место ярко выраженными различиями между популяциями сибирского осетра и тремя видами осетров, обнаружен ряд особенностей, отражающих сходство более узкой группы, а именно сибирского осетра Оби и Енисея с русским осетром Волги. Наиболее отчетливо это прослеживается по комплексу антигенов, отно-

Таблица 2.

#### Антигены сывороточных белков различных видов осетровых

В и д ы	Зоны электрофоретической подвижности					Общее число компонентов	
	Альбу-мины	глобулины			гамма-		
		альфа <sub>1</sub> -	альфа <sub>2</sub> -	бета-			
Сибирский осетр	р. Обь	$\frac{4}{2-4}$	$\frac{7}{7-8}$	$\frac{7}{4-6}$	$\frac{7}{5-8}$	$\frac{1}{0-1}$	$\frac{26}{22-24}$
	р. Енисей	$\frac{2}{2-3}$	$\frac{9}{6-8}$	$\frac{7}{6-8}$	$\frac{9}{6-7}$	$\frac{2}{0-2}$	$\frac{29}{22-25}$
	р. Лена	$\frac{2}{2}$	$\frac{6}{4-6}$	$\frac{6}{6-7}$	$\frac{6}{4-6}$	$\frac{1}{0-1}$	$\frac{21}{16-22}$
Русский осетр		$\frac{3}{1-3}$	$\frac{7}{6-8}$	$\frac{6}{5-6}$	$\frac{6}{5-6}$	$\frac{1}{0-1}$	$\frac{23}{19-23}$
	Персидский осетр	$\frac{2}{2-3}$	$\frac{5}{5-7}$	$\frac{8}{6-8}$	$\frac{6}{5-7}$	$\frac{1}{0-1}$	$\frac{22}{19-24}$
	Стерлядь	$\frac{3}{2-3}$	$\frac{8}{6-8}$	$\frac{6}{4-6}$	$\frac{10}{6-8}$	$\frac{0}{0-1}$	$\frac{27}{21-24}$
Шип		$\frac{2}{1-3}$	$\frac{8}{5-8}$	$\frac{5}{4-6}$	$\frac{7}{6-8}$	$\frac{1}{1}$	$\frac{23}{19-23}$
	Севрюга	$\frac{2}{2-4}$	$\frac{7}{6-9}$	$\frac{8}{5-9}$	$\frac{7}{5-7}$	$\frac{0}{0-1}$	$\frac{24}{20-26}$

Примечание. Над чертой - количество антигенов, выявленных в гомологичных реакциях; под чертой - в гетерологичных.

сящихся к альбуминам, альфа<sub>1</sub>- и бета-глобулинам. Персидский осетр по этим же группам белков имеет определенные отличия от этих двух видов.

Относительные величины перекрестных реакций сибирского осетра из различных водоемов, а также между тремя видами осетров, находятся на одном уровне и составляют 0.86-0.94.

Особый интерес представляют специфические антигены, выявленные после абсорбции антисывороток. У обского осетра они проявля-



ются всеми многочисленными группами белков. Альбумины, специфичные по отношению к енисейскому и персидскому осетрам, стерляди, шипу и севрюге во всех случаях совпадают по подвижности, что может свидетельствовать об их иммунохимической идентичности. Аналогичная картина наблюдается и среди альфа<sub>1</sub>-глобулинов, специфичных в отношении русского и персидского осетров, стерляди, шипа и севрюги. Иммунохимически сходными, по-видимому, являются и альфа<sub>2</sub>-глобулины, а также бета-глобулины обского осетра по отношению к стерляди и севрюге.

Енисейский осетр отличается от ленского, персидского и русского осетров одним альфа<sub>1</sub>-глобулином. Другие антигены представлены группой альфа<sub>2</sub>-глобулинов, среди которых имеются близкие по подвижности белки. Кроме того некоторыми бета-глобулинами енисейский осетр отличается от стерляди и шипа.

Таким образом, осетры Оби и Енисея, хотя и относятся к одному виду, но принципиально различаются по специфическим антигенам.

Ленский осетр отличается от енисейского и персидского осетров по одному альбумину. В реакции двойной иммунодиффузии установлена его иммунохимическая идентичность специфическому альбумину обского осетра. Это отражает определенное сходство сибирского осетра из Оби и Лены. Два других альфа<sub>1</sub>-глобулина, которыми ленский осетр отличается от русского и персидского осетров, по-видимому, являются разными антигенами.

Специфические антигены русского осетра представлены широким набором белков. Среди альфа<sub>1</sub>-глобулинов мощной дугой преципитации проявляется видоспецифический антиген, связанный с желтым пигментом сыворотки крови этого вида. Кроме него могут выявляться сходные по подвижности, но более быстродвижущиеся компоненты,

специфичные относительно енисейского и персидского осетров. Большая часть других антигенов локализована в области альфа<sub>2</sub>-глобулинов и некоторые в области бета-глобулинов. Обращает внимание тот факт, что русский осетр отличается от енисейского и обского осетров различными антигенами, а спектр специфических компонентов относительно собственно осетров более разнообразен, чем относительно стерляди, шипа и севрюги.

Принципиально иные специфические особенности обнаружены у персидского осетра. Он отличается от русского осетра двумя альфа<sub>2</sub>-глобулинами. По локализации они сходны с компонентами, которыми персидский осетр отличается от сибирского осетра Оби. Спектры специфических антигенов, относительно других видов различны, однако в разных опытах обнаружены сходные по подвижности альфа<sub>1</sub>-глобулины. Большая часть специфических белков имеет пониженную подвижность и относится к альфа<sub>2</sub>- и бета-глобулинам.

Количественная характеристика отражает неодинаковую степень различий между каспийскими и сибирскими осетрами. Наиболее резко отличаются русский и персидский осетры с одной стороны и ленская популяция сибирского - с другой: суммарно по 8-9 антигенам в 40-46 баллов. Различия между каспийскими и сибирскими осетрами из Оби и Енисея примерно одного уровня: 5-6 антигенов и 20-30 баллов, но проявляются разными антигенами.

Наши результаты иммунохимического анализа сывороточных белков, в совокупности с морфологическими данными (Беляев, 1932; Берг, 1948; Соколов, Кашин, 1965; Лукьяненко и др., 1974), позволяют рассматривать сибирского осетра Оби и русского осетра Волги как наиболее близкие формы двух видов осетров, по-видимому, представляющих единую филетическую линию.



## 2. Шесть видов осетровых.

Иммуноэлектрофоретически сывороточные белки средневожской стерляди, использованной для межвидовых исследований, дифференцируются на 27 компонентов. Менее гетерогенными являются шипа и севрюга, которые представлены в гомологичных реакциях 23 и 24 антигенами, соответственно (табл. 2).

Иммуноэлектрофореграммы всех исследованных осетровых имеют принципиально сходный план распределения антигенов. В первую очередь это связано с ярко выраженными дугами преципитации двух основных компонентов. Одна из них принадлежит альбуминам, вторая относится к бета-глобулинам. Эта дуга растянута вдоль траншеи для антисыворотки, ее центр может быть сдвинут от лунки с образцом. Дуги всех остальных компонентов проявляются менее интенсивно. Среди них имеются стабильно выявляющиеся основные антигены, характерные для определенных групп белков (рис.). Локализация, форма и интенсивность дуг преципитации определяют видоспецифичность иммуноэлектрофореграмм сывороточных белков осетровых.

Сравнение антигенов осетровых рода *Acipenser* позволило установить особенности основного компонента альфа<sub>2</sub>-глобулинов. У собственно осетров - русского, сибирского и персидского, его дуга растянута вдоль траншеи для антисывороток и глубоко проникает в зону альфа<sub>1</sub>-глобулинов. У стерляди, шипа и севрюги этот компонент образует дуги почти правильной формы. Однако, у шипа антиген, иммунохимически родственный основному альфа<sub>2</sub>-глобулину всех остальных осетровых, относится к бета-глобулинам. По совокупности всех видовых особенностей можно выделить три резко различающихся типа иммуноэлектрофореграмм: "осетровый", "шиповый" и "севрюжий". Иммуноэлектрофореграммы стерляди имеют больше сходст-

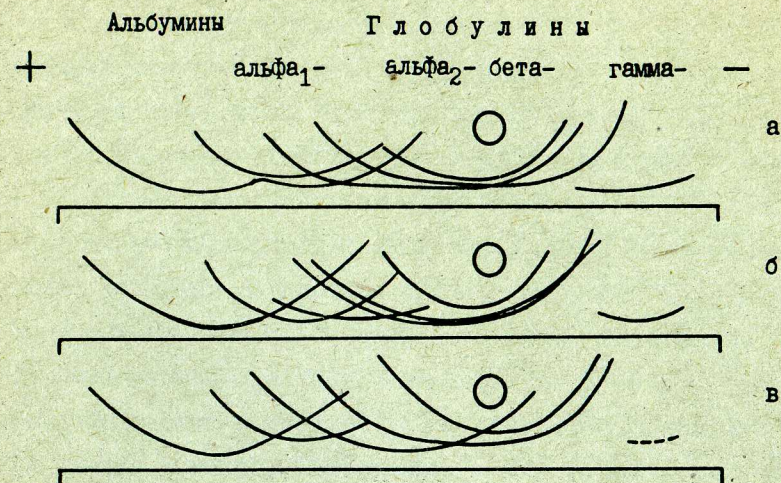


Рис. Некоторые основные антигены сывороточных белков русского и сибирского осетров (а), шипа (б), и севрюги (в).  
ва с таковыми осетров, чем шипа и севрюги.

Относительные величины перекрестных реакций, составляющие 0.83-0.92, отражают высокое антигенное сходство сывороточных белков исследованных видов осетровых рода *Acipenser*.

Специфические антигены стерляди представлены широким спектром компонентов. Альбумины, иммунохимические аналоги которых отсутствуют у персидского осетра и сибирского осетра Оби и Енисея, сходны во всех случаях по подвижности. Аналогичная картина наблюдается и с альфа<sub>1</sub>-глобулинами в этих же опытах. Также сходны между собой компоненты, относящиеся к группе быстродвижущихся альфа<sub>1</sub>-глобулинов, обнаруженные после абсорбции антисывороток белками русского осетра, шипа и севрюги. По 2 сходных альфа<sub>2</sub>-



глобулина выявляют антисыворотки, абсорбированные белками персидского осетра, шипа и севрюги. В опытах с антисыворотками, истощенными сыворотками обского осетра и шипа, имеются сходные бета-глобулины. Таким образом, некоторые специфические антигены стерляди, по отношению к различным видам осетровых, сходны по подвижности, что доказывает их иммунохимическую идентичность.

Специфические антигены шипа представлены альбуминами и бета-глобулинами. Во всех опытах, когда проявляются альбумины, специфичные относительно персидского осетра и сибирского осетра Енисея, они совпадают по электрофоретической подвижности. Аналогичные результаты получены и с бета-глобулинами. Следовательно шип отличается от всех осетровых одним и тем же бета-глобулином.

Специфические антигены севрюги в большинстве определены как альфа<sub>2</sub>- и бета-глобулины. Среди них имеется один общий альфа<sub>2</sub>-глобулин, формирующий дугу непосредственно впереди лунки для образца.

Выполненный нами иммуноэлектрофоретический анализ позволил установить, что каждому виду осетровых характерен свой определенный набор специфических антигенов, выявляемых после абсорбции антисывороток. Среди них имеется один или несколько антигенов, которыми вид отличается от всех остальных осетровых.

Количественная характеристика отражает неодинаковую выраженность специфических особенностей на межвидовом уровне. Так различия между осетрами проявляются по 4-5 антигенам и 16-24 баллам. Группа собственно осетров отличается от трех других видов по 6-9 антигенам в 22-34 балла. Между собой стерлядь, шип и севрюга различаются по 4-6 антигенам в 18-27 баллов. При анализе специфических антигенов обращает внимание русский осетр и шип. Первый

обычно имеет их больше по отношению к другим видам, чем при обратном сравнении. То есть, русский осетр обладает своего рода "универсальным" спектром антигенов, по отношению к которому антигены других видов малоспецифичны. Шипу, напротив, свойственно пониженное количество специфических антигенов. По-видимому, межвидовые особенности осетровых, проявляющиеся различным количеством специфических антигенов, обусловлены двойственной природой: с одной стороны - степенью дивергенции сывороточных белков, а с другой - уровнем полиморфизма этих белков. Поэтому виды с преобладанием мономорфизма различаются в меньшей степени, чем виды с сильно выраженным полиморфизмом. Только по двум системам сывороточных белков, таким как альбумины и трансферрины, собственно осетры более гетерогенны, чем стерлядь, шип и севрюга. При этом по гетерогенности русский осетр превосходит все остальные виды (Лукьяненко и др., 1979; Камшилин, Лукьяненко, 1981; Кузьмин, Лукьяненко, 1982, 1984, 1987; Лукьяненко, Камшилин, 1982; Лукьяненко, Кузьмин, 1983; Гераскин, Лукьяненко, Кайбелев, 1985; Кирпичников, 1987).

Не менее яркие различия между русским осетром и другими видами по изоферментному составу мышечной малатдегидрогеназы (Кузьмин, Кузьмина, 1985, 1986, 1987, 1989; Цветненко, Чихачев, Борякин, 1987). Особый интерес в плане сравнения биохимического полиморфизма представляют результаты изоэлектрофокусирования гемоглобина осетровых. У стерляди имеется один единственный фенотип (687 особей), у шипа - 2, у севрюги - 3. Русский осетр характеризуется уникальным полиморфизмом - практически каждая особь имеет индивидуальный спектр гемоглобина (Васильев, 1989).

Таким образом, межвидовые иммунохимические различия сыворо-



точных белков осетровых в определенной степени могут быть обусловлены уровнем биохимического полиморфизма.

Ярко выраженные особенности иммуноэлектрофоретических спектров в совокупности с различиями по специфическим антигенам подтверждают обоснованность выделения стерляди, шипа и севрюги из рода *Acipenser* (Гераскин, 1978; Лукьяненко, 1979, 1986; Лукьяненко, Гераскин, 1979).

В то же время вряд ли можно признать достаточно убедительным предложение объединить эти три вида в один род по принципу их малой хромосомности (Васильев, 1985), поскольку такой отдаленный вид как американский веслонос *Polyodon spathula* Walb. тоже имеет 120 хромосом (Dingerkus, Howell, 1976).

На основании установленных ранее биохимических особенностей, в совокупности с морфологическими данными, предлагается севрюгу выделить в самостоятельный род *Helops* (Лукьяненко, 1979, 1986). Дополнительным аргументом в поддержку этой точки зрения служат последние данные по составу мышечной малатдегидрогеназы. Так если у стерляди и шипа спектр МДГ идентичен, то у севрюги он принципиально отличается и аналогичен МДГ большого амударьинского лопатоноса (Кузьмин, Кузьмина, 1986, 1987).

Иммунохимические различия сывороточных белков между стерлядью и шипом сопоставимы с отличиями севрюги от этих видов, хотя количественно и уступают отличиям этих трех видов от собственно осетров. Более резкая дифференциация между стерлядью, шипом и севрюгой маловероятна, вследствие пониженного полиморфизма белков.

На лососевых описан пример, когда межродовые отличия арктического гольца *Salvelinus alpinus* и видов рода *Salmo* не превы-

шали различий между видами этого рода (Новиков, 1978). Сходные результаты получены нами в случае с шипом. Поэтому, на основании совокупных иммунохимических особенностей сывороточных белков, стерлядь и шипа так же следует рассматривать, как представителей отдельных родов.

#### ВЫВОДЫ

1. Установлена высокая степень гетерогенности антигенов сывороточных белков сибирского осетра, стерляди, шипа и севрюги: 21-30 компонентов, против 11-15, описанных для этих видов ранее. Выделены три типа иммуноэлектрофореграмм - "осетровый", "севрюжий" и "шипный".

2. Выявлена видоспецифичность иммуноэлектрофоретических спектров сывороточных белков исследованных осетровых. Для каждого вида характерен свой набор специфических антигенов. Некоторые из этих антигенов специфичны по отношению ко всем остальным осетровым.

3. Сибирский, русский и персидский осетры представляют единую группу внутри рода *Acipenser*. Сибирский и русский осетры наиболее сходны по антигенам их сывороточных белков. Вероятно сибирский осетр Оби и русский осетр Волги являются единой фалетической линией.

4. Совокупность полученных иммунохимических данных подтверждает обоснованность выделения стерляди, шипа и севрюги из рода *Acipenser* и родовую самостоятельность севрюги. Стерлядь и шипа, по-видимому, следует рассматривать как представителей самостоятельных родов.

5. Внутривидовая изменчивость антигенных спектров обуслов-



лена количественными различиями белка, приходящегося на иммунохимически сходные компоненты у рыб разных популяций и группировок. Качественные отличия по специфическим антигенам обычно выражены слабо.

6. Обнаружена внутривидовая иммунохимическая гетерогенность сибирского осетра рек Оби, Енисея и Лены. Антигенные различия сывороточных белков енисейского и ленского осетров превышают межпопуляционные и сопоставимы с межвидовыми.

7. Получены новые доказательства существования в бассейне реки Волги шести иммуногенетически самостоятельных популяций стерляди: верхневолжской, средневолжской, нижневолжской, дельтовой, окской и камской, а также двух экологических рас - туводной и полупроходной.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Иммунохимические особенности антигенов сывороточных белков стерляди волжского бассейна могут быть использованы для контроля её популяционной структуры. С учетом иммуногенетических данных искусственное разведение стерляди должно быть направлено на воспроизводство отдельных популяций в ареале их обитания.

2. Отличия русского осетра от персидского по желтому пигменту сыворотки крови, связанному с видоспецифическим антигеном, позволяют использовать этот биохимический маркер для направленного подбора производителей при искусственном воспроизводстве этих видов на рыбоводных заводах Каспийского бассейна и их дифференцировке на местах нагула.

3. Антигенные различия осетра и стерляди могут быть исполь-

зованы для выявления гибридов при рыбоводных работах на реке Енисей.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Особенности антигенного состава сывороточных белков русского осетра // У Всесоюз. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб. Тез. докл. - Севастополь, 1982. - С. 30-32.

2. Иммунохимический анализ антигенного состава сывороточных белков трех аллопатрических популяций сибирского осетра // Осетровое хоз-во внутр. водоемов СССР. Тез. докл. Всесоюз. совещан. - Астрахань, 1984. - С. 204-205 (В соавторстве с В.В. Лукьяненко).

3. Сравнительное иммунохимическое изучение сывороточных белков окской и волжской стерляди // Осетровое хоз-во внутр. водоемов СССР. Тез. докл. Всесоюз. совещан. - Астрахань, 1984. - С. 346-348 (В соавторстве с Т.А. Субботкиной).

4. О специфическом антигене русского осетра // Экологическая физиология и биохимия рыб. Тез. докл. VI Всесоюз. конф. по экологической физиологии и биохимии рыб. - Вильнюс, 1985. - С. 245-246 (В соавторстве с Т.А. Субботкиной).

5. Особенности антигенного состава сывороточных белков двух экологических рас волжской стерляди *Acipenser ruthenus* (L) // Биология внутр. вод: Информ. бюл. - Л., 1986. - № 69. - С. 48-52 (В соавторстве с В.И. Лукьяненко и Т.А. Субботкиной).

6. Количественная оценка антигенной дифференциации сывороточных белков осетровых р. *Acipenser* // Тез. докл. III Всесоюз. совещан. по генетике, селекции и гибридизации рыб. - М., 1986. - С. 214-216.

7. Иммунохимические особенности антигенного состава сывороточных белков каспийских и сибирских осетров // Вопр. эволюционной физиологии. IX Совещан. по эволюционной физиологии. - Л., 1986. - С. 272.

8. Сравнительный иммуноэлектрофоретический анализ сывороточных белков шипа // I-й симпозиум по экологической биохимии рыб. - Ярославль, 1987. - С. 183-186.

9. Иммунохимический анализ сывороточных белков сибирского



осетра обской популяции // I-й симпозиум по экологической биохимии рыб. - Ярославль, 1987. - С. 186-188.

10. Антигенный состав сывороточных белков камской популяции стерляди // I-й симпозиум по экологической биохимии рыб. - Ярославль, 1987. - С. 188-190 (В соавторстве с Т.А. Субботкиной).

11. Сравнительный иммунохимический анализ межвидовых и внутривидовых особенностей сывороточных белков трех видов рода *Acipenser* // Вопр. ихтиологии. - 1987. - Т. 27, вып. 5. - С. 794-800.

12. Специфические антигены сывороточных белков двух популяций сибирского осетра // Экологическая физиология и биохимия рыб. Т. II. Тез. докл. VI Всесоюз. конф. - Ярославль, 1989. - С. 158-159.

13. Иммунохимическое родство русского и сибирского осетров по антигенам их сывороточных белков // Экологическая физиология и биохимия рыб. Т. II. Тез. докл. VI Всесоюз. конф. - Ярославль, 1989. - С. 160-161.

14. Сравнительный иммунохимический анализ сывороточных белков сибирского осетра енисейской популяции // Экологическая физиология и биохимия рыб. Т. II. Тез. докл. VI Всесоюз. конф. - Ярославль, 1989. - С. 162-163 (В соавторстве с Т.А. Субботкиной).

15. Межвидовые особенности специфических антигенов сывороточных белков русского осетра и шипа // Осетровое хоз-во водоемов СССР. Тез. докл. Всесоюз. совещан. Ч. I. - Астрахань, 1989. - С. 305-306.

16. Сравнительный иммунохимический анализ сывороточных белков двух видов осетров Каспийского бассейна // Осетровое хоз-во водоемов СССР. Тез. докл. Всесоюз. совещан. Ч. I. - Астрахань, 1989. - С. 308-301.

17. Иммуноэлектрофоретический состав сывороточных белков шипа // Биология внутр. вод: Информ. бюл. - Л., 1991. - № 89. - (В печати).

-----  
Подписано к печати 25/X-91г

Заказ 248

Объем - 1,5 п. л.

Формат 60x84 1/16 Тираж 100

Ротапринт ВНИРО, Москва, 107140, В Красносельская, 17