

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ
ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ
АМУРСКОГО ОСЕТРА (*Acipenser schrenckii* × *A. baerii*, *A. baerii* ×
× *A. schrenckii*, *A. schrenckii* × *A. ruthenus* И *A. ruthenus* × *A. schrenckii*)
ПО ДАННЫМ ИЗМЕНЧИВОСТИ МУЛЬТИЛОКУСНЫХ
RAPD-МАРКЕРОВ**

© 2008 г. К. В. Рожкован¹, Г. Н. Челомина¹, Е. И. Рачек²

¹ Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Владивосток 690022; e-mail: chelomina@ibss.dvo.ru

² Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, Владивосток 690950

Поступила в редакцию 16.02.2007 г.

Окончательный вариант получен 28.08.2007 г.

Метод полимеразной цепной реакции со случайными праймерами (RAPD-PCR) использовали для идентификации потомства от скрещивания трех видов осетровых рыб: амурского (*Acipenser schrenckii* Brandt, 1869), сибирского (*A. baerii* Brandt, 1869) осетров и стерляди (*A. ruthenus* Linnaeus, 1758). С помощью 10 праймеров даны описание и оценка генетической изменчивости у 70 сеголеток, полученных в результате семи индивидуальных скрещиваний: *Acipenser schrenckii* × *A. schrenckii*, *A. baerii* × *A. baerii*, *A. ruthenus* × *A. ruthenus*, *A. schrenckii* × *A. baerii*, *A. baerii* × *A. schrenckii*, *A. schrenckii* × × *A. ruthenus* и *A. ruthenus* × *A. schrenckii*. Установлено, что выборки гибридов индивидуального скрещивания более вариабельны, чем выборки родительских видов; объединенные выборки гибридов от двух направлений скрещивания, напротив, генетически менее разнообразны, чем объединенные выборки их родителей. Выявлено три основных особенностей RAPD-спектров гибридов: 1) сохранение в одном геноме маркерных фрагментов ДНК обоих родителей, 2) наличие специфичных фрагментов ДНК, отсутствующих у родителей, и 3) зависимость частоты встречаемости некоторых фрагментов ДНК от направления скрещиваний. Многомерное шкалирование (MDS) отчетливо разделяет в пространстве трех координат особей исходных видов и гибридное потомство с дифференциацией на группы прямых и обратных гибридов. Анализ родственных связей (UPGMA, NJ) указывает на существенную дифференциацию видов как между собой, так и с гибридным потомством и на тесные генетические связи между гибридами прямого и обратного скрещиваний. Мультилокусные RAPD-маркеры в сочетании со статистическими методами признаются полезными для дискриминации межвидовых гибридов осетровых рыб. Обсуждаются возможные причины отличий в RAPD-спектрах гибридов.

Молекулярные методы являются необходимым инструментом для дискриминации гибридов, часто невозможной с помощью морфологических подходов. Идентификация гибридных форм первоначально основывалась на аллозимах [1], затем стали использовать маркеры ДНК, такие как рибосомные гены [2], микросателлиты [3, 4], локусы AFLP [5] и RAPD [6, 7]. Проблема идентификации гибридов особенно актуальна для пресноводных рыб, межвидовая гибридизация у которых является более обычной, чем для других позвоночных [8].

Представители *Acipenseriformes* – древняя группа, включающая наиболее ценные виды пресноводной ихтиофауны; полиплоидная природа их генома, видимо, способствует межвидовой и межродовой гибридизации [9, 10]. Чрезмерный вылов, строительство дамб и экологические за-

грязнения привели практически все виды осетровых на грань исчезновения [9]. Недавно на Дальнем Востоке стали интенсивно разводить два азиатских вида, амурского осетра *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 и калугу *Huso dauricus* (Georgi, 1775), а также их гибриды с различными видами осетровых рыб. Межвидовые гибриды составляют значительную часть осетров из фермерских хозяйств благодаря их высокой продуктивной эффективности. Поэтому идентификация гибридов необходима не только для биологии сохранения видов, но также для качественной сертификации коммерческих продуктов.

В связи с этим мы провели тестирование надежности метода RAPD-PCR анализа для идентификации амурского и сибирского осетров, стерляди и реципрокных гибридов. С помощью RAPD-маркеров проведена генетическая диффе-

ренциация чистых видов и межвидовых гибридов первого поколения. Для сравнительного анализа геномной вариабельности использовали одинаковое число потомков от каждого из семи индивидуальных скрещиваний; результаты обрабатывали с помощью кластерного анализа и многомерного шкалирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего проанализировано 70 особей трех видов осетровых рыб (амурского *Acipenser schrenckii*, сибирского *A. baerii* осетров и стерляди *A. ruthenus*) и их F₁ гибридов (*A. schrenckii* × *A. baerii*, *A. baerii* × *A. schrenckii*, *A. schrenckii* × *A. ruthenus* и *A. ruthenus* × *A. schrenckii*). Эксперименты по скрещиванию проведены на базе рыбоводного хозяйства Лучегорской научно-исследовательской рыбноводной станции ТИПРО-центра (п. Лучегорск Приморского края) с использованием особей из природных популяций. Потомство от каждого скрещивания содержали в отдельных садках.

Геномную ДНК получали из крови хвостовой вены сеголеток стандартным фенольно-детергентным методом с последующей обработкой протеиназой K [11]. Для проведения RAPD-PCR использовали десять олигонуклеотидных праймеров (OPA-01 CAGGCCCTTC; OPA-04 AATCGGGCTG; OPA-18 AGGTGACCGT; OPA-19 CAAACGTCGG; OPC-09 CTCACCGTCC; OPF-07 CCGATATCCC; OPF-08 GGGATATCGG; OPF-15 CCAGTACTCC; OPF-20 GGCTCAGAGG; OPZ-01 TCTGTGCCAC). Реакцию PCR с произвольными праймерами и электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили, как описано ранее [7].

Для статистической обработки результатов по каждому из спектров были составлены бинарные матрицы, где отсутствие или присутствие в образце амплифицированного фрагмента обозначали соответственно “0” и “1”. На основании суммарной бинарной матрицы для каждой выборки высчитывались следующие параметры: число локусов (N); число полиморфных локусов (Np); число гибридно-специфичных локусов (Nh); полиморфизм (P и P_{95} , %) и индекс гетерогенности выборки Шеннона (I). Дифференциацию сравниваемых выборок оценивали по стандартным генетическим дистанциям (D) Нея. Для вычисления перечисленных генетических показателей использовали пакеты программ POPGENE 1.31 [12] и TFPGA 1.3 [13]. Многомерное шкалирование (MDS) выполняли в программе NTSYS [15] для установления основных дивергентных групп. Для установления родственных связей между осетрами использовали методы ближайшего связывания (NJ) и невзвешенный парно-групповой метод средних арифметических (UPGMA) в программе TREECON [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В целом в трех видовых и четырех гибридных выборках использованные праймеры генерировали 252 фрагмента ДНК (локуса) с молекулярной массой 160–2600 пн. Число детектируемых фрагментов в объединенных выборках родительских видов ($\bar{N} = 177$) было выше по сравнению с таковыми гибридов ($\bar{N} = 140$). Среди выборок индивидуального скрещивания число локусов, генерируемых 10 праймерами, изменялось в меньших пределах ($N = 124$ –136) и было выше у гибридов (таблица, а, б).

RAPD-спектры демонстрировали достаточно высокую специфичность, позволяя визуально проводить таксономическую идентификацию. Например, праймер OPA-18 выявлял таксон-специфичные фрагменты длиной 1140 и 1030 пн, блок фрагментов в диапазоне 1000–870 пн и 420-пн фрагмент в геномах *A. schrenckii*, *A. baerii* и *A. ruthenus* соответственно (рис. 1,а). У реципрокных гибридов RAPD-спектры были более похожими между собой, чем с родительскими видами, и имели ряд отличительных черт, которые могут быть обобщены следующим образом. Геномы гибридов включают маркерные фрагменты ДНК обоих родителей (рис. 1,б–г) и содержат дополнительные, отсутствующие в геномах их родителей: 30 (13%) гибридно-специфичных фрагментов ДНК обнаружено в гибридах между *A. schrenckii* и *A. ruthenus* и 41 (19%) таких “неродительских” фрагментов идентифицирован у гибридов между *A. schrenckii* и *A. baerii*; наследование некоторых локусов связано с направлением скрещивания: 440-пн фрагменты ДНК амурского осетра чаще проявляются в потомстве, когда самка этого вида скрещивалась с самцом сибирского осетра или стерляди, чем при обратном скрещивании (рис. 1,в, г).

Из 216 локусов, выявленных у 40 особей *A. schrenckii*, *A. baerii* и их гибридов, 83.3% были полиморфными; 51.4% локусов полиморфны в родительской группе и только 18.5% – в группе гибридов (таблица, а). Аналогичны результаты для такой же по величине выборки *A. schrenckii*, *A. ruthenus* и их гибридов. Из 223 идентифицированных локусов 85.2% были полиморфными для всей выборки, 56.5% и 17.9% – для родительской и гибридной групп соответственно (таблица, б). Введение 95%-ного критерия не оказывало существенного влияния на значения полиморфизма. При анализе каждой выборки в отдельности уровень полиморфизма значительно понижался, однако гибриды оказывались более полиморфными, чем их родители: $\bar{P} = 10.4\%$ и $\bar{P} = 7.8\%$ соответственно (см. таблицу). Показатель уровня гетерогенности выборки Шеннона обнаружил такие же закономерности: индивидуальные выборки гибридов были более гетерогенны ($\bar{I} = 0.06$),

Параметры генетической изменчивости в выборках разных видов осетровых рыб и их гибридов

а					
Выборки	<i>N</i>	<i>N_p</i>	<i>N_h</i>	<i>I</i>	<i>P</i> , %
<i>A. schrenckii</i>	124	12	–	0.03	5.6
<i>A. baerii</i>	130	21	–	0.05	9.7
	(126)	(17)	–	(0.04)	(7.7)
<i>A. schrenckii</i> + <i>A. baerii</i>	173	111	–	0.34	51.4
<i>A. schrenckii</i> × <i>A. baerii</i>	134	19	39	0.05	8.8
<i>A. baerii</i> × <i>A. schrenckii</i>	136	24	39	0.06	11.1
	(135)	(22)	(39)	(0.06)	(10)
<i>A. schrenckii</i> × <i>A. baerii</i> + <i>A. baerii</i> × <i>A. schrenckii</i>	142	40	41	0.10	18.5
В целом	216	180	41	0.47	83.3
б					
Выборки	<i>N</i>	<i>N_p</i>	<i>N_h</i>	<i>I</i>	<i>P</i> , %
<i>A. schrenckii</i>	124	12	–	0.03	5.6
<i>A. ruthenus</i>	130	22	–	0.05	9.9
	(127)	(17)	–	(0.04)	(7.8)
<i>A. schrenckii</i> + <i>A. ruthenus</i>	181	126	–	0.36	56.5
<i>A. schrenckii</i> × <i>A. ruthenus</i>	136	29	25	0.07	13.0
<i>A. ruthenus</i> × <i>A. schrenckii</i>	130	19	29	0.05	8.5
	(133)	(24)	(27)	(0.06)	(10.8)
<i>A. schrenckii</i> × <i>A. ruthenus</i> + <i>A. ruthenus</i> × <i>A. schrenckii</i>	137	0	30	(0.06)	17.9
В целом	223	190	30	0.48	85.2

Примечание. *N* – число идентифицированных локусов; *N_p* – число полиморфных локусов; *N_h* – число гибрид-специфичных локусов; *I* – информационный индекс гетерогенности выборки Шеннона; *P*, % – процент полиморфных локусов; в скобках указаны средние значения.

чем выборки их родителей ($\bar{I} = 0.04$), но объединение реципрокных гибридов повышало генетическое разнообразие менее эффективно ($\bar{I} = 0.095$), чем объединение исходных видов ($\bar{I} = 0.35$) (см. таблицу).

Результаты анализа генетических дистанций указали на более высокую дифференциацию видов ($\bar{D} = 0.60$) по сравнению с гибридами ($\bar{D} = 0.045$), а также на существенную дифференциацию между гибридами и родительскими таксонами ($\bar{D} = 0.49$). Многомерное шкалирование, основанное на данных генетических дистанций, продемонстрировало хорошее разделение сравниваемых видов и их гибридного потомства в пространстве трех координат, причем также эффективно разделились гибриды от разных направлений скрещивания (рис. 2, а, б). Бескорневые NJ-деревья формировали отдельные ветви для каждого из родительских видов и для их гибридов со 100%-ной статистической поддержкой (рис. 3, а, б). Метод UPGMA оказался менее эффективным для дифференциации сравниваемых форм (данные не приведены).

Мультилокусные RAPD-маркеры успешно применяются для идентификации видов в разных группах животных, включая Acipenseridae [16, 17]; доказано, что они особенно полезны для выявления гибридов [18]. Недавно среди осетровых рыб Каспийского моря был дискриминирован широко используемый в аквакультуре бестер *H. huso* × *A. ruthenus* [16]. В настоящей работе мы показали, что метод RAPD-PCR также пригоден для идентификации F₁ гибридов амурского осетра со стерлядью и сибирским осетром. Это важно, так как у осетров первая генерация гибридов не всегда является морфологически промежуточной по отношению к родительским видам, а морфологическая “промежуточность” – не всегда показатель межвидовой гибридизации [19].

Межвидовая гибридизация имеет широкие последствия, в частности, может повышать генетическую изменчивость и генерировать новые признаки или их комбинации [20]. В этом плане осетровые рыбы не стали исключением: полученные данные свидетельствуют о повышенной генетической изменчивости гибридов по сравнению с исходными видами и появлению у них новых признаков (фрагментов ДНК).

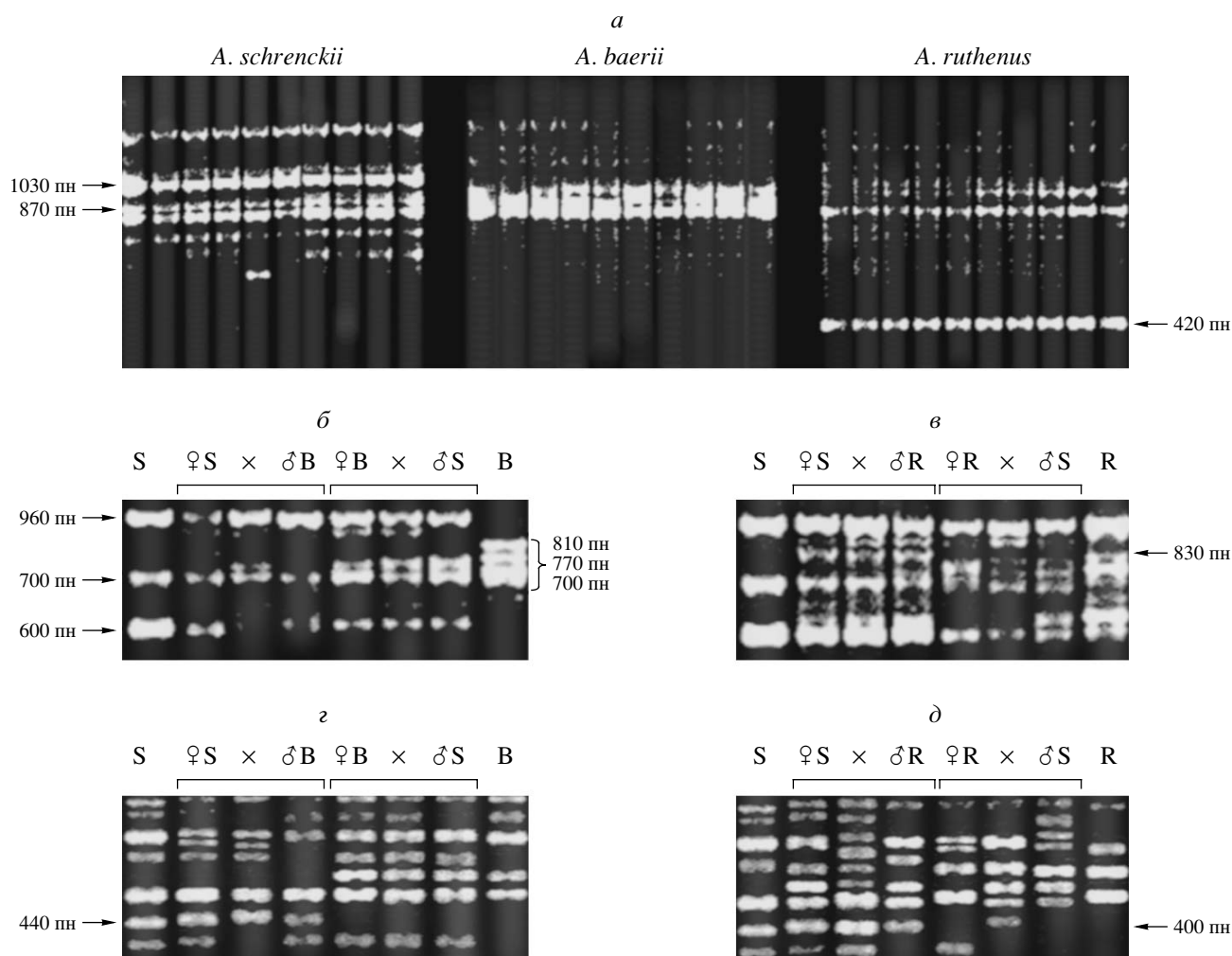


Рис. 1. RAPD-спектры осетровых рыб, генерируемые праймером OPA-18 (а), OPC-09 (б, в) и OPF-08 (з, д). S – *Acipenser schrenckii*, B – *A. baerii*, R – *A. ruthenus*. Стрелками указаны маркерные фрагменты ДНК.

Нами не выявлено пониженного уровня генетической изменчивости *A. ruthenus* ($n = 118$) относительно *A. schrenckii* ($n = 240$) и *A. baerii* ($n = 248$), хотя теоретически пloidность может влиять на изменчивость [21]. Возможно, такой результат связан с непрерывным процессом функциональной редукции уровня пloidности у осетров [21, 22]. Обнаружение разного количества специфичных фрагментов ДНК у гибридов между равно- и разнoхромосомными видами согласуется с имеющимися данными о прекопуляционных изолирующих механизмах, которые лучше развиты между видами осетров, менее всего отличающимися по числу хромосом [22].

Присутствие диагностических RAPD-локусов обоих родителей может считаться общим свойством для F_1 генерации у разных видов [23, 24]. Некоторые мономорфные видоспецифичные фрагменты ДНК, т.е. потенциально пригодные

для идентификации гибридов, не обнаруживались нами в геномах гибридных рыб. Теоретически, если маркерные мономорфные локусы являются гомозиготными, они должны передаваться F_1 потомству как одиночные аллели и, вследствие доминантной природы RAPD-маркеров, определяться в геномах всех гибридов. Однако некоторые фиксированные RAPD-маркеры (особенно в малых выборках, являющихся обычными для редких видов) не являются гомозиготными, поэтому у гибридов они могут отсутствовать [5].

Появление дополнительных фрагментов ДНК в геномах гибридов менее предсказуемо, если локусы наследуются по законам Менделя. Хотя последние исследования показали, что гибридизация с последующей геномной дупликацией часто сопровождается неортодоксальными генетическими и эпигенетическими изменениями, которые нарушают принципы Менделя [25]. Первоначально гибриды

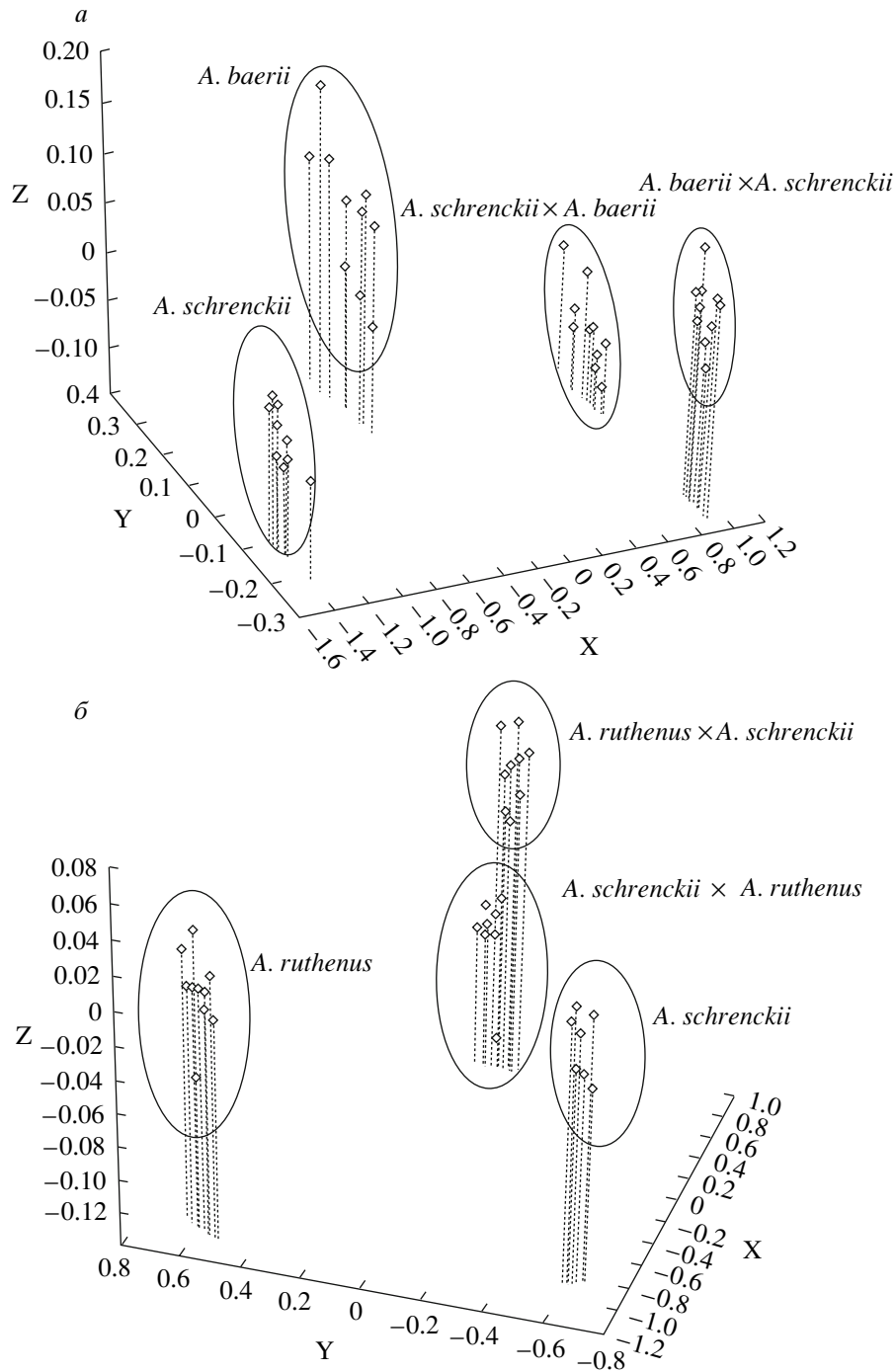


Рис. 2. Распределение в трехмерном пространстве потомков от скрещивания амурского осетра с сибирским осетром (а) и стерлядью (б).

специфические локусы (названные “гибризмами”, или “редкими аллелями”), отсутствующие в родительских таксонах, были выявлены с помощью аллозимного анализа, позднее – с помощью техники PCR [5, 26]. Предположили несколько механизмов, объясняющих феномен гибризм: транспозиции или транслокации между родительскими генами, преимущество редких аллелей и повышенные ско-

рости нуклеотидных замен в гибридах [27], которые, мы полагаем, могут быть задействованы и в отношении RAPD-локусов.

Пропорция неродительских RAPD-фрагментов в гибридном потомстве широко варьирует: от <1% у бандикутов и озерной форели до избытка у приматов [28–30]. Достаточно высокое число таких фрагментов у гибридов осетровых рыб воз-

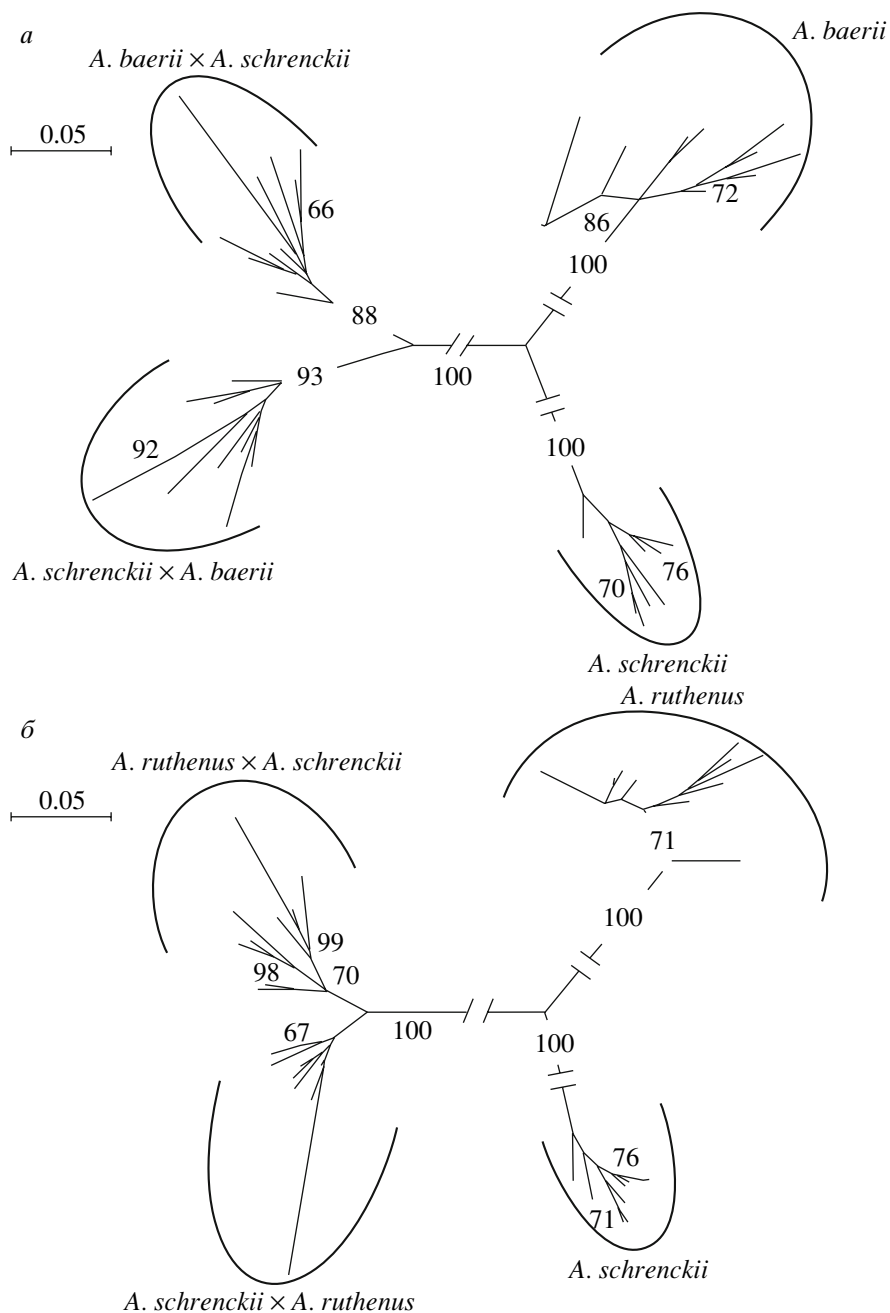


Рис. 3. Бескорневое NJ-дерево, отображающее родственные связи гибридов амурского осетра с сибирским осетром (а) и со стерлядью (б) между собой и с родительскими видами.

можно по ряду причин: полиплоидия родительских видов, искусственное происхождение и принадлежность к первой генерации. Так, у полиплоидов хромосомы чаще, чем у диплоидов, ассоциированы в мультиваленты, имеют место экстенсивные генные дубликации; следует ожидать поэтому, что межвидовая гибридизация приносит дополнительные (по сравнению с диплоидами) геномные преобразования, влияющие, в частности, на появление редких аллелей у гибри-

дов [19]. Гибридизация полиплоидов обычно рассматривается как эволюционный неуспех из-за проблем хромосомного спаривания в мейозе. Однако у природных гибридов *Dactylis*, в отличие от искусственных, спаривание хромосом в мейозе проходит вполне успешно, что предполагает существование у них отбора, влияющего на стабильность мейоза [31].

Зависимость RAPD-спектров от направления скрещиваний, видимо, обусловлена опосредован-

ным влиянием пол-связанных локусов. Неслучайная ассоциация была выявлена между генотипами аллозимного локуса *HEX-2* и пол-специфичного локуса *SEX* в популяции лососей [19]. Когда существуют отличия в аллельных частотах между самцами и самками (например, из-за гибридизации), связь с пол-детерминирующим локусом будет воздействовать на генотипы других локусов, что может привести к избытку (относительно ожидаемого по Харди-Вайнбергу значения) гетерозигот в потомстве. Восстановление случайной ассоциации между пол-специфичными и другими локусами будет влиять на скорость рекомбинации только у гетерогаметного пола. Такой сценарий вполне возможен и для осетров, гетерогаметным полом у которых являются самки [32].

И многомерное шкалирование, и реконструкции родственных связей ясно дискриминировали систематические группы осетров, по-разному оценивая дивергенцию между видами и внутри них; причем гибриды проявляли большее генетическое сходство между собой, чем с родителями. Положение гибридов амурского осетра на филогенетических деревьях типично для первой генерации, что также показано для F₁ гибридов между *A. naccarii* и *A. transmontanus* [5].

Таким образом, полученные результаты показали, что, несмотря на определенные трудности работы с полиплоидами и их гибридным потомством, доминантные мультилокусные RAPD-маркеры пригодны для идентификации межвидовых гибридов амурского осетра с родственными видами. Они позволяют ясно различать родителей и их гибридов, в том числе от реципрокных скрещиваний, что очень важно при изучении природных популяций осетровых рыб с неизвестной генетической структурой для оздоровления и сохранения их генетического разнообразия.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта ДВО РАН "Амурская экспедиция".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allarcón J.A., Alvarez M.C. Genetic identification of sparid species by isozyme markers: application to interspecific hybrids // *Aquaculture*. 1999. V. 173. P. 95–103.
2. Pendas A.M., Moran P., Martinez J.L., Garcia-Vazquez E. Application of 5S in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon × brown trout hybrid identification // *Mol. Ecol.* 1995. V. 4. P. 275–276.
3. Shikano T., Taniguchi N. Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy *Poecilia reticulata* as a fish model // *Aquaculture*. 2002. V. 204. P. 271–281.
4. Zhu B., Zhou F., Cao H. et al. Analysis of genetic variation in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population // *J. Appl. Ichthyol.* 2002. V. 18. P. 301–306.
5. Congiu L., Dupanloup I., Patarnello T. et al. Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon // *Mol. Ecol.* 2001. V. 10. P. 2355–2359.
6. Хрисанфова Г.Г., Луданный Р.И., Слынько Ю.В. и др. RAPD фингерпринт леща (*Abramis brama* L.), плотвы (*Rutilus rutilus* L.) и гибридов первого поколения лещ × плотва и плотва × лещ // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 10. С. 1432–1436. (Chrisanfova G.G., Ludanny R.I., Slyn'ko Yu.V. et al. RAPD fingerprinting of common bream *Abramis brama* L., roach *Rutilus rutilus* L., and their F1 hybrids (*A. brama* × *R. rutilus* and *R. rutilus* × *A. brama*) // *Rus. J. Genetics*. 2004. V. 40. № 10. P. 1182–1185.)
7. Спиридонова Л.Н., Челомина Г.Н., Стариков В.П. и др. RAPD-PCR анализ сусликов Тоболо-Ишимского междуречья: свидетельства межвидовой гибридизации большого *Spermophilus major* и краснощекого *S. erythrogegens* сусликов // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 9. С. 1210–1221. (Spiridonova L.N., Chelomina G.N., Starikov V. et al. RAPD-PCR analysis of ground squirrels of Tobol-Ishim interflaves: evidences of interspecies hybridization between *Spermophilus major* and *S. erythrogegens* // *Rus. J. Genetics*. 2005. V. 41. № 9. P. 991–1001.)
8. Allendorf F.W., Waples R.S. 1996. Conservation and genetics of salmonid fishes // *Conservation genetics (case histories from nature)* / Ed. J.C. Avise and J.L. Hamrick. N.Y.: Chapman & Hall, P. 238–280.
9. Birstein V.J., Bemis W.E., Waldman J.R. The threatened status of acipenseriform species: a summary // *Env. Biol. Fishes*. 1997. V. 48. P. 427–435.
10. Fontana F., Tagliavini J., Congiu L. Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives // *Genetica*. 2001. V. 111. P. 359–373.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
12. Yeh F.C., Boyle T.B.J. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits // *Belgian J. Botany*. 1997. V. 129. P. 157.
13. Miller M.P. Tools for population genetics analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population data. 1997. Computer software distributed by author.
14. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the constructions and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // *Comput. Applic. Biosci.* 1994. V. 10. P. 569–570.
15. Rohlf J.F. Numerical taxonomy system of multivariable statistical programs (NTSYS-pc). 1992.
16. Comincini S., Lanfredi M., Rossi R., Fontana F. Use of RAPD markers to determine the genetic relationships among sturgeons (Acipenseridae, Pisces) // *Fish. Sci.* 1998. V. 64. P. 35–38.
17. Барминцев В.А., Чудинов О.С., Зеленина Д.А. и др. Проблемы молекулярно-генетической идентификации осетровых рыб Каспийского моря // *Биологические аспекты аквакультуры*. Астрахань, 2004. С. 147–153.

18. Hadrys H., Balick M., Schierwater B. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology // *Mol. Ecol.* 1992. V. 1. P. 55–63.
19. Tranah G., Campton D.E., May B. Genetic evidence for hybridization of pallid and shovelnose sturgeon // *J. Heredity.* 2004. V. 95. P. 474–480.
20. Goldman D.H., Jansen R.K., Van Den Berg C. et al. Molecular and cytological examination of *Calopogon* (Orchidaceae, Epidendroideae): circumscription, phylogeny, polyploidy, and possible hybrid speciation // *Amer. J. Bot.* 2004. V. 91. P. 707–723.
21. Ludwig A., Belfiore N.M., Pitra C. et al. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) // *Genetics.* 2001. V. 158. P. 1203–1215.
22. Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука, 1985. 300 с.
23. Garner K.J., Slavicek J.M. Identification and characterization of RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moth // *Insect. Mol. Biol.* 1996. V. 5. P. 81–91.
24. Liu Z.F., Li P., Argue B.J., Dunham R.A. Inheritance of RAPD markers in channel catfish *Ictalurus punctatus*, blue catfish *I. furcatus*, and their F1, F2 and backcross hybrids // *Animal. Genet.* 1998. V. 29. P. 58–62.
25. Wang Y.-M., Dong Z.-Y., Zhang Z.-J. et al. Extensive *de novo* genomic variation in rice introduced by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.) // *Genetics.* 2005. V. 170. P. 1945–1956.
26. Woodruff D.S. Genetic anomalies associated with Cerion hybrid zones: the origin and maintenance of new electrophoretic variants called hybridzymes // *Biol. J. Linn. Soc.* 1989. V. 36. P. 281–294.
27. Schilthuizen M., Hoekstra R.F., Gittenberger E. Selective increase of a rare haplotype in a land snail hybrid zone // *Proc. R. Soc. Lond.* 1999. V. 266. P. 2181–2185.
28. Riedy M.F., Hamilton W.J.III, Aquadro C.F. Excess of nonparental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 918.
29. Scott W., Ihssen P.E., White B.N. Inheritance of RAPD molecular markers in lake trout *Salvelinus namaycush* // *Mol. Ecol.* 1997. V. 6. P. 609–613.
30. Cooper M.L. Random amplified polymorphic DNA analysis of southern brown bandicoot (*Isodon obesculus*) populations in western Australia reveals genetic differentiation related to environmental variables // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. P. 469–479.
31. Adams K.L., Wendel J.F. Allele-specific, bidirectional silencing of an alcohol dehydrogenase gene in different organs of interspecific diploid cotton hybrids // *Genetics.* 2005. V. 171. P. 2139–2142.
32. Van Eenennaam A.L., Murray J.D., Medrano J.F. Karyotype of the American green sturgeon // *Transact. Amer. Fish. Soc.* 1999. V. 128. P. 175–177.

Molecular Identification and the Features of Genetic Diversity in Interspecific Hybrids of Amur Sturgeon (*Acipenser schrenckii* × *A. baerii*, *A. baerii* × *A. schrenckii*, *A. schrenckii* × *A. ruthenus*, and *A. ruthenus* × *A. schrenckii*) Based on Variability of Multilocus RAPD Markers

K. V. Rozhkovan^a, G. N. Chelomina^a, and E. I. Rachek^b

^a*Institute of Biology and Soil Science, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia;*

e-mail: chelomina@ibss.dvo.ru

^b*Pacific Fisheries Research Center, Vladivostok, 690950 Russia*

The method of polymerase chain reaction with random primers (RAPD PCR) was used to identify the progeny of the crosses between three sturgeon species, Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii* Brandt, 1869), Siberian sturgeon (*A. baerii* Brandt, 1869), and sterlet (*A. ruthenus* Linnaeus, 1758). Using ten primers, genetic variation in 70 yearlings, produced in seven individual crosses: *Acipenser schrenckii* × *A. schrenckii*, *A. baerii* × *A. baerii*, *A. ruthenus* × *A. ruthenus*, *A. schrenckii* × *A. baerii*, *A. baerii* × *A. schrenckii*, *A. schrenckii* × *A. ruthenus*, and *A. ruthenus* × *A. schrenckii* was described and evaluated. It was demonstrated that the samples composed of hybrids from individual crosses were more variable than the samples of parental species. On the other hand, pooled samples of hybrids from two cross directions were genetically less variable than the pooled samples of their parents. The three main features of the hybrid RAPD profiles identified included: (1) preservation of marker DNA fragments of both parents in one genome; (2) presence of specific DNA fragments, absent from both parents; and (3) dependence of the frequency of some DNA fragments from the cross direction. Multidimensional scaling clearly distinguishes in the space of three coordinates the individuals of original species and the hybrid progeny with differentiation in the groups of direct and backcross hybrids. Analysis of relationships (UPGMA and NJ) pointed to substantial differentiation between the species, as well as between the species and hybrid progeny. Close genetic relationships between direct and backcross hybrids were demonstrated. Multilocus RAPD markers in association with statistical methods are considered to be the useful tool for discrimination of interspecific hybrids of sturgeon. Possible reasons for the differences in the hybrid RAPD profiles are discussed.