



003463979

На правах рукописи
УДК 575.22:597.583.1

ТИМОШКИНА НАТАЛЬЯ НИКОЛАЕВНА

**ВНУТРИВИДОВОЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ
РУССКОГО ОСЕТРА (*Acipenser gueldenstaedtii*)**

Специальность 03.00.15 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

1 2 11 12 01 09

Москва -2009

Работа выполнена в Азовском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства (АзНИИРХ).

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор
Усатов Александр Вячеславович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Васецкий Сергей Григорьевич

доктор биологических наук,
профессор
Асланян Марлен Мкртычевич

Ведущая организация: Кубанский государственный университет

Защита состоится “25” марта 2009 г. в 14 часов на заседании
Диссертационного совета № Д002.238.01 Учреждения Российской
академии наук Института биологии развития РАН им. Н.К. Кольцова.
Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26. Телефон: 8 (499) 135 33 22,
факс: (499) 135-80-12, e-mail: idbras@bk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения РАН
Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Автореферат разослан 24 февраля 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук _____ **Абрамова Е.Б.**
e-mail: ele0806@yandex.ru

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833) относится к реликтовой группе хрящевых ганоидов, первые находки которых датируются верхнеюрским периодом (более 200 млн. лет). До недавнего времени вид был многочисленным в фауне внутренних водоемов Евразии (бассейнов Каспийского и Черного морей) и имел большое промысловое значение. На сегодняшний день, русский осетр, как и другие 24 представителя отряда *Acipenseriformes*, отнесен к группе редких видов и включен в Приложение II CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (Raymakers, 2006). Катастрофическое снижение численности русского осетра в основном обусловлено интенсивным строительством гидротехнических сооружений, препятствующих проходу половозрелых особей к местам нереста, расположенным в верховьях рек. Кроме того, высокий спрос и цена на черную икру и товарную осетрину привели к чрезмерному вылову (Vaisman, Raymakers, 2001). Восполнение численности русского осетра в значительной мере осуществляется за счет искусственного воспроизводства на рыбоводных заводах. Так, например, в азовской популяции доля искусственно воспроизведенных рыб достигает 95% (Реков, 2000). В связи с этим мероприятия по поддержанию численности вида должны учитывать сохранение его устойчивости, в значительной мере обусловливаемой его генетической гетерогенностью, и, соответственно, требуют знаний об эволюционно сформировавшейся популяционной структуре вида. Внутривидовая систематика русского осетра остается до сих пор предметом дискуссий. Основываясь на поведенческих, экологических и меристических признаках, одни авторы подразделяют *A. gueldenstaedtii* на 3–4 географически изолированные формы с несколькими нерестовыми популяциями в каждой (Берг, 1948; Чугунов и др., 1964; Подушка, 2003), другие выделяют только популяции (Соколов, 2002; Vecsei, 2004). В современной систематике наряду с морфологическим анализом широко используются методы оценки генетического полиморфизма с помощью молекулярных маркеров. Ранее проведенные исследования русского осетра выявили высокий уровень полиморфизма белков крови (Субботкин, 1987) и митохондриальной ДНК (Birstein, 2000; Корниенко и др. 2003; Doukakis et al., 2005; Rastorguev et al., 2008). Высокая плоидность генома (Birstein et al.,

1997; Fontana et al., 2001), затрудняют анализ полиморфизма по ядерным маркерам. В литературе имеются данные по оценке полиморфизма некоторых видов осетровых рыб с помощью AFLP и микросателлитного (STR) анализа (Jenneckens et al., 2001; King et al., 2001; Congiu et al., 2002; Zane et al., 2002; Welsh et al., 2003). Популяционная структура и полиморфизм русского осетра по этим параметрам изучены в меньшей степени.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является исследование внутри- и межпопуляционного генетического полиморфизма русского осетра с помощью морфологического, а также молекулярно-генетического анализов с использованием методов RAPD, STR и ПЦР-идентификации митохондриальных гаплотипов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи.

1. Исследовать уровень морфологической изменчивости азовской популяции русского осетра и сравнить с ранее опубликованными данными по изменчивости популяций Каспийского моря и северо-западной части Черного моря.
2. Изучить с помощью RAPD- и STR-маркеров внутри- и межпопуляционную генетическую изменчивость вида.
3. Определить тип наследования ряда известных микросателлитных (STR) маркеров в экспериментальных скрещиваниях русского осетра.
4. Оценить эффективность использования микросателлитных маркеров для определения популяционной принадлежности особей русского осетра.
5. С целью определения частоты встречаемости «baerii-like» митотипа провести широкомасштабный скрининг трех (каспийской, азовской и черноморской) популяций русского осетра.

Научная новизна полученных результатов. Впервые с помощью морфологических и молекулярно-генетических маркеров проведен сравнительный анализ изменчивости трех популяций русского осетра (азовской, каспийской и западно-черноморской). Исследована частота встречаемости митохондриального маркера («baerii-like» гаплотип) в азовской и черноморской популяциях. Для этих популяций определена также временная динамика частот встречаемости изученных митохондриальных гаплотипов. Предложена экспериментально обоснованная методика

популяционной идентификации особей русского осетра с использованием базы аллельных частот STR-локусов. Получены молекулярно-генетические доказательства микроэволюционных процессов дивергенции черноморской и каспийской популяции с последующим отделением азовской популяции.

Практическая значимость работы. Полученные результаты имеют важное значение для изучения эволюционной систематики и филогении рода *Acipenser* и вида *Acipenser gueldenstadtii*. Предложен набор генетических маркеров, который используется для индивидуальной паспортизации половозрелых особей русского осетра на осетровых рыбоводных заводах Каспийского бассейна. Выявленная временная динамика частот «сибиреподобного» («baerii-like») гаплотипа мтДНК и популяционных частот STR-аллелей может быть использована для более корректной оценки промышленного возврата особей русского осетра при искусственном воспроизводстве осетровых в Азовском бассейне.

В ходе выполнения экспериментальной части работы для постановки индивидуальных скрещиваний был создан лабораторный стенд для инкубации икры рыб, который зарегистрирован 27.05.2007 в Госреестре полезных моделей РФ (патент № 63172). Был предложен способ иммобилизации образцов очищенной ДНК, предусматривающий ее выделение, очистку и заключение в защитную оболочку для длительного хранения, что позволяет оптимизировать работу с тканевыми и ДНК-содержащими пробами (дата приоритета 14.11.2007).

Материалы диссертации включены в состав учебных материалов для занятий студентов биолого-почвенного факультета ЮФУ по курсам «Генетика» и «Теория эволюции», а также по специальным курсам кафедры генетики.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на Международной конференции «Новые технологии в защите биоразнообразия в водных экосистемах» (Москва, 2002); Международной научной конференции «Проблемы естественного и искусственного воспроизводства рыб в морских и пресноводных водоемах» (Ростов-на-Дону, 2004); Международном семинаре «Современные технологии мониторинга и освоение природных ресурсов южных морей России» (Ростов-на-Дону, 2005); I Международной конференции «Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов» (Москва, 2006); II

Международной рабочей встрече «Identification of Acipenseriformes Species in Trade» (Берлин, 2006); Международной научной конференции «Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем» (Ростов-на-Дону, 2006); III Научно-практической конференции «Экологические проблемы. Взгляд в будущее» (СОЛ «Лиманчик», 2006); Съезде Украинского общества генетиков и селекционеров, посвященном 120-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова (Алушта, 2007); IX Съезде Белорусского общества генетиков и селекционеров (Гомель, 2007); Конференции «Вавиловские чтения – 2007» (Саратов, 2007); Международном симпозиуме «Структура и функционирование естественных и антропогенных экосистем» (Кишинев, 2008); II Международной научно-практической конференции «Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов» (Москва, 2008); IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); Международной конференции «Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб» (Санкт-Петербург, 2008); II Международной научной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2008).

Публикация материалов исследования. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 6 в журналах перечня ВАК, 10 тезисов докладов на международных конференциях, получено 2 патента.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 32 рисунка и 27 таблиц. Список цитируемой литературы включает 154 источника.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему руководителю А.В. Усатову за внимательное и конструктивное руководство, Н.С. Мюге за неоценимую помощь в работе, при обсуждении диссертации. Также автор выражает благодарность группе исследователей, оказавших содействие в сборе материалов для настоящей работы: сотрудникам АзНИИРХ Ю.И. Рекову, Д.А. Подойницину, Н.А. Небесихиной, А.Е. Барминцевой (ВНИРО, г. Москва), А.Н. Михайлюку и А.К. Чашину (ЮгНИРО, г. Керчь, Украина), В.Ю. Шевченко и И.М. Чурай (ДОРЗ, г. Херсон, Украина).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом настоящего исследования был русский осетр *Acipenser gueldenstaedtii Brandt, 1833*. Использовали особей из трех популяций (азовской, каспийской, черноморской), выловленных в 1999-2005 гг. в северо-западной акватории Черного моря (86 экз.), в Азовском море (92 экз.), а также в северной части Каспийского моря (360 экз.). Для молекулярно-генетических исследований прижизненно отбирали и фиксировали в 96%-ом этаноле тканевые пробы плавников рыб. Использовали также спилы первого луча грудного плавника особей из коллекции ихтиологических сборов АзНИИРХ, проводившихся в Азовском и Черном морях в период с 1960 по 1971 гг.

Для определения характера наследования STR-маркеров были поставлены экспериментальные скрещивания между произвольно отобранными родительскими парами русского осетра азовской популяции. Полученное потомство инкубировали до стадии перехода личинок на активное питание строго по семьям с использованием оригинального лабораторного стенда. Работы проводили на базе ФГУ «Ачужевский ОРЗ» (Краснодарский край) в 2006 г.

Морфометрический анализ проводили по признакам, общепринятым в систематике осетровых рыб: определяли число лучей в спинном плавнике (*D*), число лучей в анальном плавнике (*A*), число жаберных тычинок (*GR*), количество спинных жучек (*DS*), количество боковых жучек (*LS*), количество брюшных жучек (*VS*), длину головы (*C*), абсолютную длину тела (*AL*) (Vecsei et al., 2004). В сравнительный межпопуляционный анализ включены результаты аналогичных измерений рыб каспийской и черноморской популяций из работ Берга (1948) и Подушки (2003).

Тотальную ДНК выделяли из фрагментов плавников методом солевой экстракции (Aljanabi and Martinez, 1999), с нашими модификациями для экстракции ДНК из архивных спилов лучей плавника.

RAPD-анализ. В предварительных экспериментах из 30 случайных олигонуклеотидов, различающихся по размеру и содержанию GC-пар, мы отобрали пять праймеров, при использовании которых были получены четкие, стабильно воспроизводимые, полиморфные спектры (рис. 1): OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3'), OPA-07 (5'-GAAACGGGTG-3'), OPB3 (5'-CATCCCCCTG-3'), OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3'), P8 (5'-

ССТGACCAGGCACTGGCAGA-3'). ПЦР проводили в стандартных условиях (Зеленина и др., 2006). Продукты амплификации фракционировали методом электрофореза в 6%-ом ПААГ. Полученные RAPD-профили представляли в виде общей бинарной матрицы типа «объект-признак» с помощью программы Phoretix 1D Database (“Nonlinear Dynamics”, Великобритания).

Анализ микросателлитной ДНК (STR). Анализ проводили методом, первоначально разработанным для видов *A. naccarii* (Zane et al., 2006), *A. fulvescens* (Welsh et al., 2003) и *A. oxyrinchus* (King et al., 2001) по четырем микросателлитным локусам: An20, Afug41, Afug51, AoxD165. Условия проведения ПЦР были оптимизированы для исследуемого вида *A. gueldenstadtii*. ПЦР-продукты фракционировали в денатурирующем ПААГ согласно (Muzyer and Smalla, 2003).

Статистическая обработка данных. Учитывая доминантную природу RAPD-локусов и тетраплоидность исследованного вида, рассчитывали частоту рецессивного нуля-аллеля q'_i , несмещенную оценку гетерозиготности H'_i и ее дисперсию $Var(H'_i)$ согласно Хедрик (2003), Токарская и др. (2000). Эффективную численность популяции определяли вычислением с использованием экспериментально определенных параметров по предложенным нами формулам.

Частоту аллелей микросателлитных локусов p_i рассчитывали разработанным нами методом кумулятивного «минус-аллеля». Для проверки эффективности микросателлитного анализа для определения популяционной принадлежности особи проводили “assignment test” (Hansen и др., 2001). F_{ST} -статистику Райта (Хедрик, 2003), генетическое расстояние D по Нею (Nei, 1972) вычисляли с помощью программы Arlequin 3.0. (Excoffier et al., 2005). Достоверность различий средних значений оценивали с помощью F -критерия Фишера, t -критерия и χ^2 (Lewontin, 1972; Хедрик, 2003).

Определение митотипов: «baerii-like» (BL) и «русский» (GUE). BL и GUE митотипы определяли с помощью метода видовой идентификации осетровых рыб, предложенного в работе Мюге и др. (2008).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфологический полиморфизм популяций русского осетра. Результаты морфометрического анализа азовской популяции в сравнении с каспийской и черноморской приведены в табл. 1.

Таблица 1. Сравнительная характеристика популяций *A. gueldenstadii* по морфометрическим показателям

Показатель		Популяции		
		Каспийская	Азовская	Черноморская
Число лучей в спинном плавнике (D)	среднее значение	41,0	35,7	36,3*
	пределы	33–51	27–41	30–43
Число лучей в анальном плавнике (A)	среднее значение	25,8	21,9	23,9
	пределы	21–33	18–25	20–28
Число жаберных тычинок (GR)	среднее значение	23,5	21,5	21,8
	пределы	19–29	16–26	17–27
Кол-во спинных жучек (DS)	среднее значение	12,1	11,9	12,0
	пределы	9–18	8–15	9–15
Кол-во боковых жучек (LS)	среднее значение	39,0	30,5	34,2
	пределы	30–50	25–36	27–38
Кол-во брюшных жучек (VS)	среднее значение	9,8	9,6	9,6
	пределы	7–12	8–11	7–12
Отношение длины головы к абсолютной длине тела (C/AL), %		18,1	16,4	17,5

Примечание: жирным шрифтом выделены показатели, имеющие промежуточные значения при сравнении трех популяций. Значения показателей каспийской и черноморской популяции приводятся по (Берг, 1948; Подушка, 2003).

Самая большая из трех по численности каспийская популяция обладает большим размахом изменчивости по всем изученным признакам. По большинству морфометрических показателей черноморская популяция занимает промежуточное положение по отношению к каспийской и азовской выборкам (табл. 1). Сравнительный анализ, проведенный на основании данных многолетнего мониторинга размерно-возрастного состава азовской

популяции и средних показателей размеров разных возрастных групп каспийской и черноморской популяций, выявил, что азовская популяция характеризуется достоверно более интенсивной скоростью роста ($F = 0,93$ и $1,10$, соответственно, $p < 0,05$).

Сравнительная межпопуляционная оценка средних значений данных морфометрии, проведенная с помощью F -критерия Фишера, выявила существенное различие только между азовской и каспийской популяциями по единственному морфометрическому показателю – количеству лучей в спинном плавнике (D). Таким образом, полученные результаты показывают, что на практике использование классической морфометрии для идентификации популяционной принадлежности особей неэффективно.

Межпопуляционные различия русского осетра по RAPD-маркерам.
Пример RAPD-профилей, полученных для двух нерестовых популяций (каспийской и азовской) русского осетра, приведен на рис. 1.

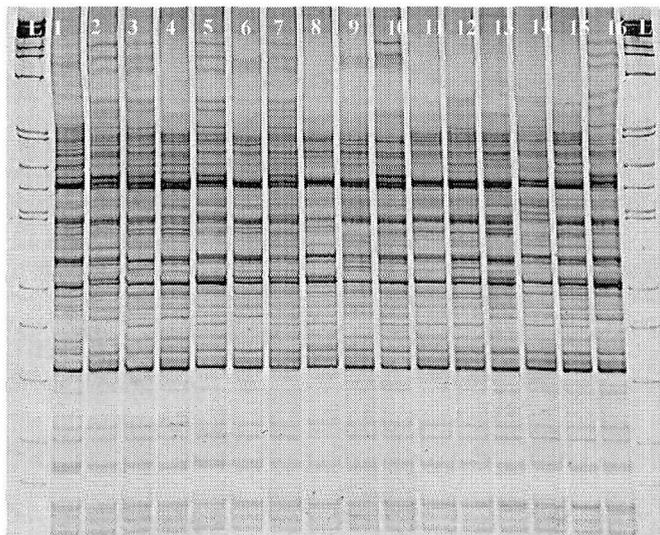


Рис. 1. Электрофореграмма RAPD-фрагментов русского осетра по праймеру ОРА07. 1–8 – особи азовской популяции, 9–16 – особи каспийской популяции, L - маркер молекулярной массы ДНК λ /PstI (Fermentas).

Размеры проанализированных RAPD-фрагментов варьировали от 250 до 1000 пн. Общее количество RAPD-фрагментов по пяти использованным

праймерам составило 295, из которых 22 являются мономорфными и, при сравнении с RAPD-профилями северяги и стерляди, видоспецифичными. Среднее количество фрагментов на особь варьировало от 23,2 (OPA-05) до 30,5 (OPA-07). Анализ генетической изменчивости выборок русского осетра из азовской популяции, относящихся к поколениям 1978–1983 гг. и 1993–2000 гг., показал недостоверность различий (средние значения гетерозиготности – H_j^i 0,355±0,135 и 0,316±0,137, соответственно), что свидетельствует об отсутствии в популяции временного тренда.

Сравниваемые выборки каспийской и азовской популяций в целом имеют высокий уровень полиморфизма (табл. 2). Кластерный анализ (UPGMA), проведенный на основании RAPD-спектров, не выявил межпопуляционных различий. На фоне высоких значений внутривидового полиморфизма (H_j^i , P) уровень межпопуляционной дифференциации оказался также недостоверным ($F_{ST}=0,011$).

Таблица 2. Показатели изменчивости анализируемых групп русского осетра по RAPD-локусам, полученным с помощью пяти праймеров

Популяции	Среднее значение q_j^i	t-критерий ($P<0.001$)	Уровень полиморфизма $P, \%$	Среднее значение гетерозиготности H_j^i	Дисперсия $Var(H_j^i)$
Азовская	0,813	5,809	92,3	0,379	0,060
Каспийская	0,799		93,6	0,396	0,059

Результаты RAPD-анализа использовали для расчета эффективной численности популяций. Оказалось, что для сохранения с 99%-ой вероятностью наиболее редкого RAPD-аллеля ($q_j^i=0,016$) количество производителей, отбираемых для искусственного воспроизводства русского осетра, должно быть не менее 205.

Анализ наследования STR-маркеров русского осетра. Нами получены результаты анализа распределения генотипов в четырех экспериментальных скрещиваниях русского осетра. Согласно полученным данным во всех вариантах скрещивания распределение комбинаций аллелей и их частоты у потомства соответствуют тетрасомному типу наследования (достоверность различий оценена с помощью критерия χ^2). Пример

наследования аллелей в экспериментальном скрещивании представлен на рис. 2.

Неполное совпадение опытного и ожидаемого распределения в отдельных случаях наиболее вероятно вызвано ограниченностью размеров выборки потомства. Учитывая менделеевские закономерности, распределение аллельных частот в F_1 было использовано для уточнения генотипа гетерозиготных тетраплоидных родителей.

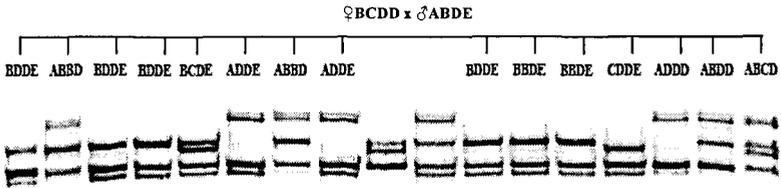


Рис. 2. Тетрасомный характер наследования в микросателлитном локусе Afug41. Генетический анализ экспериментального скрещивания ♀BCDD x ♂ABDE (в центре) и генотипы полученного потомства (указаны для каждого F1). Каждый потомок наследует два любых аллеля одного родителя, и два другого в случайной комбинации.

Межпопуляционные различия русского осетра по STR-локусам.

Данные микросателлитного анализа трех популяций русского осетра по четырем локусам представлены в табл. 3 и на рис. 3.

Анализ STR-спектров выявил в исследованной выборке в среднем более семи аллелей на локус. Все локусы оказались полиморфными. В сумме у проанализированных особей ($n=540$) в четырех локусах выявлено 74 аллеля. Число аллелей на локус в среднем варьировало от 11,5 (AoxD165) до 17,5 (Afug51). Каждая из исследованных популяций имела набор аллелей, достоверно различающихся по частотам ($p<0.01$). Исключение составил локус AoxD165, по которому не выявлено различий между каспийской и азовской популяциями.

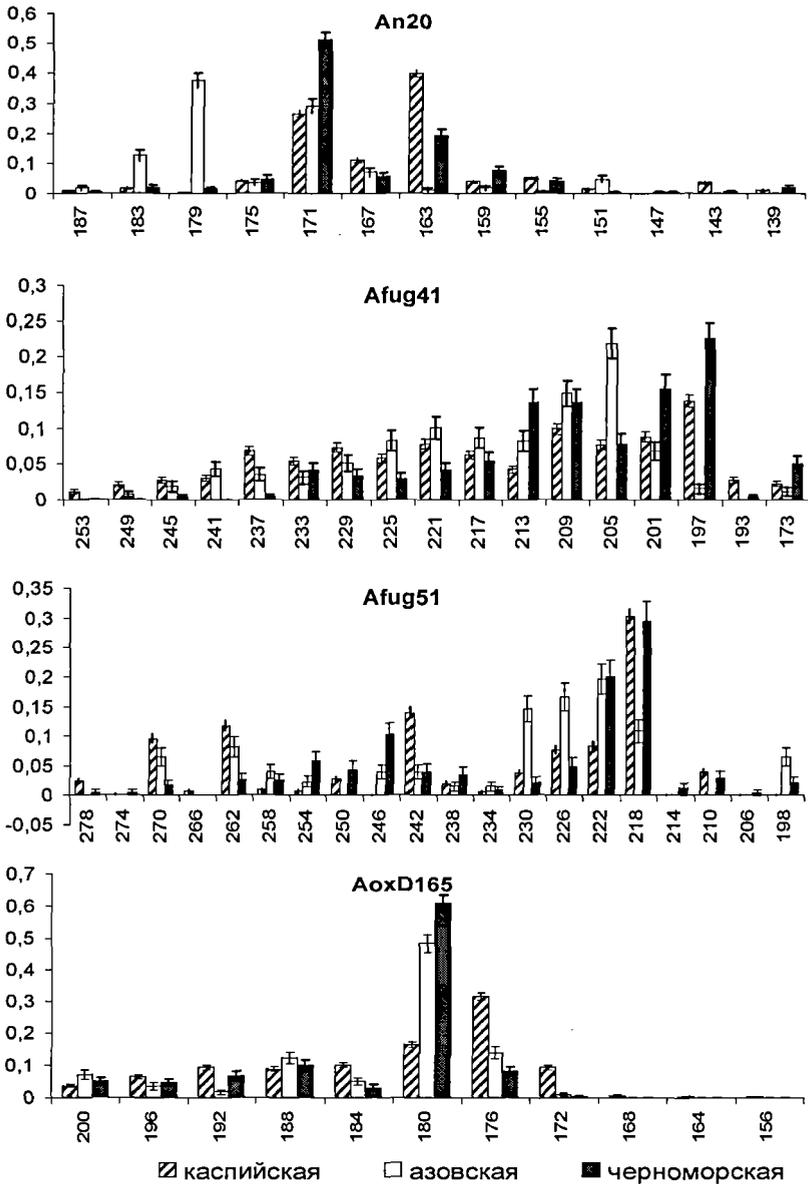


Рис. 3. Распределение частот аллелей микросателлитных локусов в популяциях русского осетра. По осям абсцисс – размеры аллелей, пн; по осям ординат – аллельные частоты, выраженные в долях с обозначением 95%-ных доверительных интервалов.

Таблица 3. Значения показателей межпопуляционной изменчивости русского осетра по микросателлитным локусам

Локус	Число аллелей	Гетерозиготность наблюдаемая, H_0	Гетерозиготность ожидаемая, H_E	Коэффициент внутри выборочный F_{IS}
Азовская популяция				
An 20	11	0,940	0,969	0,033
Afug 41	15	0,986	0,998	0,010
Afug 51	13	0,730	0,999	0,267
AoxD 165	10	0,911	0,957	0,035
Среднее значение		0,892		0,096
Каспийская популяция				
An 20	13	0,971	0,971	-0,000
Afug 41	23	0,995	0,999	0,005
Afug 51	18	0,837	0,998	0,155
AoxD 165	16	0,962	0,992	0,027
Среднее значение		0,941		0,046
Черноморская популяция				
An 20	14	0,871	0,944	0,068
Afug 41	15	0,971	0,997	0,025
Afug 51	20	0,885	0,998	0,108
AoxD 165	9	0,796	0,934	0,080
Среднее значение		0,881		0,109

Значения наблюдаемой гетерозиготности (H_0) по микросателлитным локусам близки к ожидаемым (H_E) в каспийской выборке и несколько занижены в азовской и черноморской (табл. 3). Наибольшее аллельное разнообразие по всем локусам выявлено в каспийской выборке. В результате тестирования данных микросателлитного анализа на соответствие равновесию Харди-Вайнберга в черноморской и азовской популяциях был выявлен дефицит гетерозигот ($F_{IS} > 0$). В азовской популяции снижение гетерозиготности, возможно, вызвано дрейфом генов, поскольку анализировали выборки, усредненные по многим генерациям. Каждое поколение формировалось искусственно относительно небольшим числом особей, используемых в качестве производителей на осетровых рыбоводных заводах. Этот же эффект вероятен и для черноморской выборки. Кроме того, так как она представлена двумя нерестовыми субпопуляциями - днепровской

и дунайской, то в данном случае может иметь место эффект Валунда, характерный для выборок из генетически подразделенных популяций (Алтухов, 1997).

Таблица 4. Матрица значений F_{ST} (в верхней правой части таблицы) между выборками русского осетра и результаты вероятностного теста p на значимость различий (в левой нижней части таблицы)

	Каспийская	Азовская	Черноморская
Каспийская	-	0,070	0,058
Азовская	0,00024	-	0,043
Черноморская	0,00293	0,06641	-

Высокая вариабельность внутри популяций и тетраплоидная природа локусов определила небольшой уровень межпопуляционной изменчивости русского осетра (1,9 %). Тем не менее, полученные значения генетических расстояний F_{ST} для каждой пары исследованных групп достоверно значимы (табл. 4). При этом межпопуляционные генетические различия в 4 - 7 раз превышают межгодовые различия между поколениями в азовской популяции.

Выявленное распределение аллельных частот в каждой популяции русского осетра было использовано для оценки эффективности популяционной идентификации особей. Для этого использовали выборки, полностью состоящие из особей одной популяции. Для каждой особи на основании наблюдаемого распределения аллельных частот в четырех локусах рассчитывали вероятность принадлежности к каждой из трех популяций. Наибольший показатель вероятности определял особь в соответствующую популяцию. В среднем, доля особей, принадлежность которых была определена корректно, составила 86%. Максимальная точность определения рассчитана для черноморской популяции - 96%, для каспийской популяции этот показатель составил 86%, для азовской – только 67%.

Следует отметить, что точность идентификации зависит от общего числа признаков (в нашем случае – аллелей). Ранее в исследовании популяционной принадлежности нерки по STR-маркерам было показано, что для достижения 80%-ной точности необходимо проанализировать не менее

80 аллелей (Beachem et al., 2002). Кроме того, разрешающая способность микросателлитного анализа зависит от степени полиморфизма локусов. В работе исследовали высокополиморфные маркеры. Для повышения корректности идентификации особей азовской популяции следует увеличить количество STR-локусов.

Определение BL и GUE митотипов. Ранее было показано, что около трети особей русского осетра из Каспийского моря имеют гаплотип, четко отличающийся от мтДНК, типичной для этого вида (Jenneckens и др., 2000; Мюге и др., 2008), и характеризующийся высокой гомологией с мтДНК сибирского осетра (*A. baerii*). По аналогии с латинским наименованием вида этот митотип был обозначен как “baerii-like”(BL). Мы провели массовый скрининг по данному митохондриальному маркеру и видоспецифичному для русского осетра GUE-митотипу в выборках трех популяций (табл. 5).

Таблица 5. Количество особей с митотипами «baerii-like» (BL) и видоспецифичным (GUE) в популяциях русского осетра

Популяции	Кол-во исследованных особей	Кол-во особей с видоспецифичным (GUE) митотипом		Кол-во особей с «baerii-like» (BL) митотипом	
		абсолютное	%	абсолютное	%
Каспийская	527	362	68,69	165	31,31
Азовская (генерации 1931-1956 гг.)	102	102	100,00	0	0,00
Азовская (генерации 1980-2005 гг.)	759	745	98,12	14	1,88
Черноморская (генерации 1945-1970гг.)	163	163	100,0	0	0,00

Частота встречаемости BL-особей в каспийской популяции была близка ранее показанной и составила 31%. В черноморской выборке во всех исследованных образцах BL-митотип отсутствовал. В азовской популяции из 759 исследованных рыб идентифицировано 14 BL-особей. Для определения происхождения BL-митотипа в Азовском море дополнительно были проанализированы выборки из полностью сменившихся поколений азовской и черноморской популяций, относящихся к поколениям естественного нереста. В этих группах BL- маркер не обнаружен (табл. 5).

В настоящее время русский осетр обитает в пределах морей, весьма различающихся по экологическим особенностям, а его внутривидовая дифференциация связана с эволюцией трех морей. Известно существование в конце плейстоцена распресненного водоема, располагавшегося в Азово-Черноморском бассейне, связь которого со Средиземным морем прекратилась вследствие падения уровня Мирового океана 15-40 тыс. лет назад (Федоров, 1978; Свиточ и др., 1999). Азовское море в этот период исчезало и превращалось в низменную долину, пересекаемую рекой Дон. Отсутствие VL-митотипа в черноморской популяции свидетельствует о незначительности или отсутствии миграции русского осетра из Каспийского моря в бассейн Черного моря по существовавшему непродолжительное время в конце ледникового периода Кумо-Манычскому водосбросу. Последовавшая затем трансгрессия Черного моря, вызванная прорывом средиземноморских соленых вод через Босфор, и появление вследствие подъема уровня вод Азовского моря позволили сформироваться азовской популяции русского осетра из части черноморской популяции и закрепили изоляцию популяций русского осетра в северо-западной части Черного моря и в Азове.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа результатов исследований можно высказать предположение, что дивергенция каспийской и черноморской популяций русского осетра предшествовала отделению азовской популяции, что объясняет промежуточное положение черноморских особей, как по морфометрическим показателям (табл. 1), так и по данным микросателлитного анализа (рис. 3).

Данные о распространении митохондриального VL-маркера (табл. 5) в современных популяциях и отсутствие его в Черном море позволяют сделать предположение о том, что появление осетров с VL-митотипом в Азовском море вероятнее всего произошло в 20 веке, когда проводилась интродукция каспийский осетровых в Азовское море (Реков, 2000), что подтверждается отсутствием маркера в выборке азовского осетра до 1960-х годов (до начала планомерного вселения осетра из Каспия).

Таким образом, генетическая структура русского осетра отражает историю формирования современного ареала вида, процессы расселения и изоляции его локальных популяций, вследствие геологических

преобразований внутриевразийских водоемов. В то же время, появление осетров с VL-митотипом в азовской популяции связано с началом интродукции каспийских осетровых в Азовское море. Данные микросателлитного анализа свидетельствуют о наименьшем уровне генетической изменчивости азовской популяции, испытывающей на протяжении последнего столетия наибольшее антропогенное давление.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительный анализ трех популяций русского осетра свидетельствует о высокой внутривидовой изменчивости основных морфометрических характеристик русского осетра, на фоне которых азовскую популяцию отличают пропорции головы (C/AL) и более интенсивная скорость роста, каспийскую – больший полиморфизм по всем изученным признакам.

2. Результаты анализа геномной ДНК по RAPD- и STR-маркерам подтверждают высокий внутривидовой полиморфизм русского осетра. По результатам STR-анализа генетическое расстояние, определенное для азовской и каспийской популяций несколько выше ($F_{ST}=0,070$), чем генетические дистанции, отделяющие черноморскую от каспийской и азовской ($F_{ST}=0,058$ и $0,043$ соответственно).

3. С помощью микросателлитного анализа родительских пар и поколения F_1 , полученного в результате экспериментальных скрещиваний, определен тетрасомный тип наследования использованных в работе STR-маркеров.

4. Исследованные маркеры микросателлитной и митохондриальной ДНК позволяют с высокой точностью определять принадлежность особей русского осетра к каспийской и черноморской популяциям (точность определения по данным STR анализа - 86 и 96% соответственно).

5. Распределение частот встречаемости “baerii-like” маркера митохондриальной ДНК дифференцирует популяции русского осетра. Обнаружение VL-маркера мтДНК в Азовском море и данные микросателлитного анализа свидетельствуют об изменениях в сложившейся популяционной структуре и геномном разнообразии русского осетра уже в исторический период в результате искусственного воспроизводства и интенсивного рыболовства.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. Войнова Н.В., Чистяков В.А., Тимошкина Н.Н., Олейникова Н.Л., Соколова И.В., Брень А.Б. ДНКазная активность гомогенатов метаболически активных тканей русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseridae) как показатель пригодности тканей для генетического коллекционирования // Вопросы ихтиологии. 2001. Т. 41. № 6. С. 842–845.

2. Корниенко И.В., Войнова Н.В., Чистяков В.А., Тимошкина Н.Н., Вечканов Е.М., Петров А.В. Полиморфизм первичной последовательности сегмента гена цитохрома b митохондриальной ДНК азовской популяции *Acipenser gueldenstaedtii* // Вопросы ихтиологии. 2003. Т. 43. № 1. С. 73–77.

3. Черенкова И.Ф., Чистяков В.А., Тимошкина Н.Н., Соколова И.В. Интенсивность свободнорадикальных процессов в гомогенатах метаболически-активных тканей русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseridae) как показатель пригодности тканей для генетического коллекционирования // Вопросы ихтиологии. 2003. Т. 43. № 1. С. 142–144.

4. Voynova N.V., Mirzoyan A.V., Timoshkina N.N., Rynza E.T. Occurrence of non-native specimens of Caspian origin within the Sea of Azov population of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) // J. Appl. Ichthyol. 2008. V. 24. P. 50–51.

5. Чистяков В.А., Тимошкина Н.Н., Рынза Е.Т., Мирзоян А.В., Войнова Н.В. RAPD анализ генетического разнообразия азовской популяции севрюги (*Acipenser stellatus*) и русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) // Вопросы рыболовства. 2008. Т 9. №4 (36). С. 797–801.

6. Тимошкина Н.Н., Барминцева А.Е., Усатов А.В., Мюге Н.С. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) // Генетика. 2009. № 9.

Патенты:

7. Небесихина Н.А., Тимошкина Н.Н. Патент № 63172. Лабораторный стенд для инкубации икры рыб. Зарегистрировано в Госреестре полезных моделей РФ 27.05.2007.

8. Чистяков В.А., Мирзоян А.В., Тимошкина Н.Н., Рынза Е.Т. Способ хранения ДНК. Заявка № 2007142152/13(046147) от 20.10.2008. Дата приоритета 14.11.2007.

Статьи в сборниках научных трудов и конференций:

9. Рынза Е.Т., Тимошкина Н.Н., Мухоньков М.М. Видовая идентификация археологического материала осетровых рыб с помощью метода полимеразной цепной реакции // Сб. науч. тр. АзНИИРХ (2004-2005гг.)– Ростов-на-Дону: «МедиаПресс». 2006. С.289–292.

10. Тимошкина Н.Н., Небесихина Н.А. Сравнительный анализ морфометрических показателей современной азовской популяции русского осетра // Сб. науч. тр. АзНИИРХ (2006–2007гг.) – Ростов-на-Дону: «МедиаПресс», 2008. (в печати).

11. Тимошкина Н.Н., Рынза Е.Т. Исследование влияния интродукции на генетическую структуру азовской популяции *Acipenser gueldenstaedtii* // там же.

12. Тимошкина Н.Н. Идентификация «сибирского» митотипа в азовской популяции русского осетра // Материалы Межд. науч. конф. «Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем». Ростов-на-Дону, 9-12 октября 2006 – Ростов-на-Дону: 2006. С. 424–425.

13. Тимошкина Н.Н., Рынза Е.Т., Усатов А.В. ДНК-идентификация “baerii-like” митотипа в азовской популяции русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) // Сб. науч. тр. Съезда Украинского общества генетиков и селекционеров «Достижения и проблемы генетики, селекции и биотехнологии» - Киев: Логос. 2007. Т.1. С.326–329.

14. Тимошкина Н.Н., Усатов А.В. Исследование полиморфизма микросателлитных локусов русского осетра // Сб. науч. тр. IX Съезда Белорусского общества генетиков и селекционеров, Гомель, Республика Беларусь 2-5 окт. 2007 – Минск: 2007. С 134–135.

15. Тимошкина Н.Н., Усатов А.В. Наследование микросателлитных маркеров у русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) // Мат. конф. «Вавиловские чтения – 2007». Саратов, 26-30 ноября 2007- Саратов: Научная книга. 2007. Ч.1. С.344–347.

16. Мирзоян А.В., Горбачева Л.Т., Тимошкина Н.Н., Чихачева В.П. Биологические основы сохранения русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) азовской популяции // Материалы Второй Межд. научно-практ. Конф. «Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов». Москва, 26-27 ноября 2008 – М.: изд-во ВНИРО. 2008. С. 206–208.

17. Тимошкина Н.Н., Барминцева А.Е., Мюге Н.С., Усатов А.В. Анализ генетического полиморфизма русского осетра (*Acipenser gueldenstadtii*) с помощью маркеров ядерной и митохондриальной ДНК // Мат. II Межд. науч. конф. «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» Ростов-на-Дону, 8-10 октября 2008 г. – Ростов н/Д: Изд-во ЮФУ. 2008. – С.79–81.

Тезисы докладов научных конференций:

18. Войнова Н.В., Тимошкина Н.Н., Чистяков В.А., Барминцев В.А., Абрамова А.Б., Чудинов О.С. Генетическая паспортизация производителей осетровых рыб // Тез. докл. междунар. конф. «Новые технологии в защите биоразнообразия в водных экосистемах». Москва, 27-29 мая 2002 – М.:МАКС Пресс. 2002. С. 91.

19. Чистяков В.А., Барминцев В.А., Тимошкина Н.Н., Рынза Е.Т. Количественный анализ генетических параметров азовской популяции русского осетра на основе RAPD маркеров // Тез. докл. междунар. конф. «Проблемы естественного и искусственного воспроизводства рыб в морских и пресноводных водоемах». Ростов-на-Дону, 9-10 июня 2004 - Ростов-на-Дону: изд. ООО «ЦВВР». 2004. С. 148–150.

20. Чистяков В.А., Тимошкина Н.Н., Рынза Е.Т., Мухоньков М.М., Мирзоян А.В. Использование RAPD-ПЦР для оценки генетического разнообразия азовских популяций русского осетра и севрюги // Тез. докл. межд. сем. «Современные технологии мониторинга и освоение природных ресурсов южных морей России» - Ростов-на-Дону: изд. ООО «ЦВВР». 2005. С. 161–163.

21. Тимошкина Н.Н. Исследование микросателлитных локусов производителей русского осетра // Сбор. тр. III научно-практ. конф. «Экологические проблемы. Взгляд в будущее». СОЛ «Лиманчик», 4-7 сентября 2006 - Ростов-на-Дону: 2006. С.209–210.

22. Мирзоян А.В., Тимошкина Н.Н., Рынза Е.Т., Чистяков В.А. Генетическое разнообразие азовских популяций русского осетра и севрюги: мониторинг и сохранение при искусственном воспроизводстве // Тез. 1-ой Межд. конф. «Повышение эффективности использования водных биологических ресурсов». Москва, 1-2 ноября 2006 – М.: изд-во ВНИРО. 2006. С 87.

23. Voinova N., Timoshkina N., Myrzoyn A., Rynsa E. Preliminary results on identification of Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) individuals of the Caspian origin in Asov sea // 2nd Workshop. Identification of *Acipenseriformes* Species in Trade. 29 Sept.-1 Oct. 2006. Berlin. – 2006. P. 22.

24. Тимошкина Н.Н., Рынза Е. Т., Мирзоян А. В., Усатов А. В. Использование маркера мтДНК для оценки внутривидового полиморфизма русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti*) // Сб. науч. тр. IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск, 11 - 15 мая 2008. С.272.

25. Тимошкина Н.Н., небесихина Н.А. Сравнительный анализ морфометрических показателей современной азовской популяции русского осетра // Межд. симп. «Структура и функционирование естественных и антропогенных экосистем». Кишинев, 18 августа 2008. С. 121.

26. Тимошкина Н.Н., Усатов А.В. Молекулярно-генетическая идентификация русского осетра (*Acipenser gueldenstadtii*) в условиях искусственного воспроизводства // Тез. докл. Межд. конф. «Генетика, селекция, гибридизации, племенное дело и воспроизводство рыб». С-Пб. 10-12 сентября 2008. - С.77.

27. Тимошкина Н.Н., Мирзоян А.В., Рынза Е.Т. Использование маркера мтДНК для оценки влияния интродукции на генетическую структуру азовской популяции русского осетра // там же. - С. 118–119.

Список сокращений:

пн - пары нуклеотидов;

ОРЗ – осетровый рыбоводный завод;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПААГ - полиакриламидный гель;

BL - «baerii-like» митотип;

GUE – «gueldenstadti» митотип;

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism;

STR – Short Tandem Repeats;

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA.

Печать цифровая. Бумага офсетная. Гарнитура «Таймс».

Формат 60x84/16. Объем 1,0 уч.-изд.-л.

Заказ № 1151. Тираж 100 экз.

Отпечатано в КМЦ «КОПИЦЕНТР»

344006, г. Ростов-на-Дону, ул. Суворова, 19, тел. 247-34-88
