# Геномные исследования для сохранения осетровых: анализ наследования полиплоидных локусов и разработка панели маркеров для идентификации гибридов осетровых и продукции из них*

*Н.С. Мюге, А.Е. Барминцева*

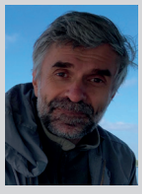
Представлены результаты анализа аллельного наследования полиморфных микросателлитных локусов, на экспериментальных скрещиваниях выявлен уровень плоидности и степень диплоидизации генома для много- и малохромосомных видов осетровых. Представлены результаты разработки системы идентификации белуги *(Huso huso)* и ее гибридов (наиболее коммерчески ценная продукция осетроводства), гибридных особей амурского осетра *(Acipencer schrenckii)* и калуги *(Huso dauricus)* (наиболее востребованный в настоящее время гибрид, активно выращиваемый в Китае и поставляемый на российский рынок), а также предложен ядерный генетический маркер для идентификации русского *(Acipencer gueldenstaedtii)* и сибирского *(A. baerii)* осетров в межвидовых гибридах. Результаты исследований нашли применение в реализации программы Росрыболовства по генетическому мониторингу искусственного воспроизводства осетровых видов рыб, а также в практике проведения видовой ДНК-идентификации черной икры и другой продукции осетровых как от чистых видов, так и от гибридных аквакультурных стад.

**Ключевые слова:** осетровые, полиплоидия, ДНК-идентификация.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №15-29-02766).*

Осетровые рыбы представляют большой интерес для изучения генетических и эволюционных процессов. Предполагается, что отряд Acipenseriformes появился в палеонтологической летописи около 200 млн лет назад во время юрского периода [1, 2]. В настоящее время почти все осетровые находятся на грани исчезновения в связи с чрезмерной эксплуатацией и потерей привычной среды обитания и естественных нерестилищ [3, 4]. Эти «живые ископаемые» важны для понимания эволюции позвоночных в целом, однако если не будет предпринято решительных мер для их спасения, остается не так много времени для их изучения. В настоящее время в России промышленный и любительский лов осетровых запрещен (за исключением некоторых популяций стерляди *(Acipencer ruthenus)* и сибирского осетра в реке Лене), а вылов осуществляется только для целей воспроизводства и научных исследований. Всё семейство осетровых Acipenseridae включено в списки Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения (CITES) [5], осетровые внесены также в различные категории Международной Красной книги (IUCN) [6].

На настоящий момент искусственное воспроизводство осетровых в нашей стране является основным источником пополнения естественных популяций. Мероприятия по поддержанию численности вида должны учитывать сохранение его устойчивости, в значительной мере обусловленной его генетической гетерогенностью, и, соответственно, требуют знаний об эволюционно сформировавшейся популяционной структуре вида. Область генетических исследований, направленная на сохранение и поддержание исчезающих видов или видов, численность которых нарушена из-за перелова и других антропогенных факторов, выделяется в настоящее время в отдельную научную дисциплину, называемую природоохранной генетикой (conservation genetics) [7]. Методы и подходы, применяемые



**МЮГЕ**
**Николай Сергеевич**
Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова



**БАРМИНЦЕВА**
**Анна Евгеньевна**
Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова

в природоохранной генетике, позволяют избежать непоправимых ошибок в деле восстановления утерянного поголовья осетровых видов рыб по всему их ареалу.

Генетические исследования, проводимые ранее на осетровых видах рыб, выявили ряд особенностей, таких как замедленный консервативный характер кариологической, биохимической и молекулярной эволюции [8–10], а также полиплоидию – увеличенное количество хромосом в кариотипе осетровых (число хромосом варьирует от 116 до 360 у разных видов) [11–14].

Осетровые являются ценными в хозяйственном отношении рыбами, а черная икра, получаемая от осетровых, – одним из самых полезных продуктов животного происхождения [15]. Осетровая икра всегда была не только дорогим деликатесом, но и знаменитым российским брендом. «Икра русского осетра, возможно, больше дала для международных отношений, чем все русские сановники вместе взятые за всю историю. Эта простая, на первый взгляд, еда стоит в одном ряду с такими общемировыми ценностями, как жемчуга, соболя, старое серебро и кубки Челлини» (Джеймс Бёрд, американский кулинар и писатель, цитируется по [16]).

Изучение организации генома осетровых рыб имеет ряд особенностей, связанных, прежде всего, с их полиплоидным происхождением, которое играет важную роль в эволюции и филогенетическом разнообразии рыб. В процессе эволюции таксона полногеномная дупликация может происходить неоднократно и независимо в различных ветвях [17].

По данным некоторых авторов, осетровые рыбы характеризуются сравнительно медленной молекулярной эволюцией, скорость накопления мутаций в их ядерных генах меньше, чем у костистых рыб Teleostei [10, 18]. Осетровые выделяются среди других рыб большой морфологической пластичностью и исключительно широко распространенной межвидовой гибридизацией даже между удаленными в систематическом отношении таксонами [19].

Было выдвинуто несколько гипотез о механизмах полиплоидизации осетровых. Одна из них предполагает автополиплоидию общего 60-хромосомного предка и дальнейшую вторичную дупликацию генома у различных дивергентно разошедшихся видов [13, 18]. Это могло произойти около 150–200 млн лет назад, поскольку видов семейства Acipenseridae с 60 хромосомами к настоящему времени не существует. Фонтана с соавт. [13] предположили четыре события полиплоидизации в эволюции осетровых видов рыб. Васильев с соавт. [14, 20] выдвинули гипотезу о том, что полиплоидизация аллоплоидного типа происходила минимум три раза с периодической межвидовой гибридизацией.

Для изучения генетического полиморфизма видов, уровня плоидности и механизмов наследования наравне с митохондриальными маркерами широко используются ядерные маркеры, в частности, микросателлитные локусы (STR), изучение их аллельного состава. Именно эти регионы ДНК, не находящиеся под давлением отбора, эволюционируя с более высокой по сравнению с ядерными белок-кодирующими генами скоростью, постепенно накапливают наследуемые в потомстве дифференциальные признаки. Микросателлитные локусы обладают менделевским кодоминантным наследованием, их локус-специфичный анализ позволяет проводить межвидовую, внутривидовую (популяционную) и индивидуальную идентификацию особей [21]. STR-локусы широко распределены по всему геному. У рыб микросателлитные локусы встречаются приблизительно каждые 10 000 пар нуклеотидов (п. н.) [22].

Особенностью мутационного процесса в микросателлитах является изменение длины последовательности, как правило, на целый повторяющийся элемент (2–6 п. н.), и эти изменения протекают с достаточно высокой скоростью [21].

Одним из ограничений этого метода является возможность использовать одни и те же локусы только для близких видов [21, 23]. Однако низкая скорость молекулярной эволюции ядерной ДНК позволяет использовать одни и те же локусы на широком круге видов осетровых [24]. Практически все праймеры, разработанные на одном из видов осетровых, амплифицируются на всех других видах с различиями в диапазоне и степени полиморфности данного локуса. Двадцать пар праймеров, сделанных для русского осетра и других видов, были амплифицированы на 10 различных видах осетровых [25].

Тетрасомное, редуцированное (дуплицированное дисомное) и октасомное наследование описано для различных видов осетровых во многих

работах. Исследуя плоидность Acipenseriformes, Людвиг с соавт. [12] на примере шести микросателлитных локусов показал, что все виды с ~120 хромосомами – функциональные диплоиды, а с ~240 хромосомами – функциональные тетраплоиды. Пятковит с соавт. [26] исследовал микросателлиты озерного осетра (*Acipencer fulvensis*) и на основе полученных данных сделал вывод о тетрасомном наследовании локусов у этого вида, хотя он также обнаружил локусы, которые давали не более двух аллелей. Другие исследователи на шести малохромосомных видах осетровых (севрюга (*A. stellatus*), белуга, стерлядь, шип (*A. nudiventris*), атлантический (*A. sturio*) и европейский осетры (*A. oxyrinchus*) показали дисомное наследование локусов, а на четырех многохромосомных видах (русский, персидский (*A. persicus*), сибирский и адриатический (*A. naccarii*) осетры) – тетрасомное. Фоп-Баят [27], анализируя гаплоидное потомство сибирского осетра, обнаружила и ди-, и тетра-, и октаплоидное наследование. Хавелка с соавт. [28] на примере анализа 11 микросателлитных локусов показали не только «традиционное» дисомное наследование для видов со 120 хромосомами и тетрасомное для видов с 250 хромосомами, но и обнаружили для четырех исследованных локусов тетрасомное наследование для первых и октасомное – для вторых.

**Изучение характера наследования паралогичных копий в исследованных ядерных локусах, определение механизма дисомного, тетрасомного и октасомного наследования дуплицированных локусов**

Для тестирования микросателлитных локусов и анализа механизмов наследования по каждому из них были сделаны экспериментальные скрещивания на различных видах осетровых видов рыб, обладающих разной плоидностью. Скрещивания проведены в осетровых хозяйствах ОРТ РТФ «Диана» (Вологодская обл.); ФГБНУ «Биос» (Астраханская обл.), ФГБНУ ВНИИПРХ (Конаково, Московская обл.). От производителей брали фрагмент спинного плавника, молодь фиксировали на день вылупления из яйца, чтобы избежать возможного смешивания подвижных личинок. Характеристика экспериментальных скрещиваний представлена в *таблице 1*.

Мы провели тестирование (тест на *хи*-квадрат распределения гамет в потомстве) 16 ранее опубликованных микросателлитных локусов на характер их наследования – дисомный, тетрасомный, диплоидизированный тетрасомный или октасомный (с разной степенью диплоидизации последнего) (*табл. 2*), а также на соответствие наследования аллелей в экспериментальных скрещиваниях распределению по Харди – Вайнбергу, отсутствию нуль-аллелей и степени полиморфизма у данного вида.

***Таблица 1.*** *Характеристика тестируемых скрещиваний*

| №п/п | Самка | Плоидность | Самец | Плоидность | Число личинок | Плоидность |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Acipencer baerii* | 4*n* | *A. baerii* (облученный) | — | 48 | 2*n* |
| 2 | *A. baerii* | 4*n* | *A. baerii* | 4*n* | 48 | 4*n* |
| 3 | *A. baerii* | 4*n* | *A. ruthenus* | 2*n* | 93 | 3*n* |
| 4 | *A. gueldenstaedtii* | 4*n* | *A. gueldenstaedtii* | 4*n* | 8 | 4*n* |
| 5 | *A. ruthenus* | 2*n* | *Huso huso* | 2*n* | 14 | 2*n* |
| 6 | *A. stellatus* | 2*n* | *A. ruthenus* | 2*n* | 14 | 2*n* |
| 7 | *A. stellatus* | 2*n* | *A. stellatus* | 2*n* | 11 | 2*n* |
| 8 | *A. ruthenus* | 2*n* | *H. huso* | 2*n* | 14 | 2*n* |

В результате анализа имеющихся литературных данных можно сделать вывод о том, что вопрос о плоидности представителей семейства Acipenseridae остается открытым и широко обсуждаемым в научной литературе. Нами показано тетрасомное наследование для всех шести многохромосомных видов осетровых (русский, сибирский, персидский, калуга, амурский, сахалинский (*A. mikadoi*) осетры), обитающих в России на пяти микросателлитных локусах, а также для ряда локусов октаплоидное и тетраплоидное наследование для много- и малохромосомных видов соответственно.


DOI: 10.22204/2410-4639-2020-106-02-78-87 № 2 (106) апрель–июнь 2020 г.

Также анализ распределения аллелей позволил выявить часто встречающиеся аномалии при гаметогенезе, а именно – нерасхождение при гаметогенезе самки части сестринских хроматид, в результате до 10% потомков образуют нехарактерные пента- и три-, а также додекаплоидные формы в зависимости от плоидности родителей, участвовавших в скрещивании.

В результате был составлен один мультиплекс, состоящий из пяти микросателлитных локусов: Afug41, Afug51, AoxD161, AoxD165, An20 (*рис. 1*), которые: имеют не более *4n* генотипов для сибирского осетра; не имеют нуль-аллелей; имеют высокую воспроизводимость амплификации; соответствуют равновесию Харди – Вайнберга; имеют наибольший аллельный полиморфизм (высокая информативность локуса); амплифицируются в мультиплексной ПЦР; имеют тетрануклеотидный повтор.

Данная панель микросателлитных локусов используется для генотипирования осетровых, в том числе с целью позитивной идентификации и осуществления прослеживаемости происхождения продукции в Науч-

***Таблица 2.*** *Характер наследования тестируемых локусов*

| Локусы | Нуль-аллель | Характер наследования локусов |
|---|---|---|
| AoxD161 | – | тетрасомное диплоидизированное |
| Afug63 | + | тетрасомное диплоидизированное |
| Afug41 An20 AoxD165 Afug51 AoxD234 | – | тетрасомное независимое |
| Afug67 | + | тетрасомное независимое |
| Afug65 Ape32 | – | октасомное независимое |
| Afug113 An40 | – | октасомное диплоидизированное |
| Afug112 | + | диплоидное |
| Afug135 | – | на разных стадиях у разных видов |
| Afug95 Afug174 | – | неполиморфные локусы |

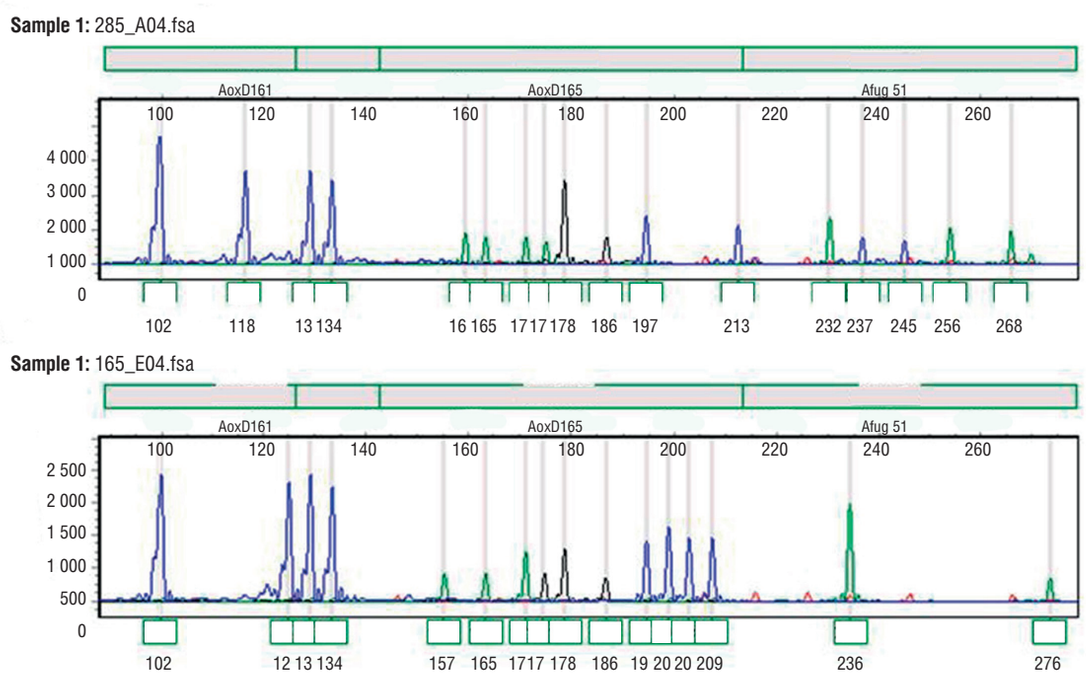



***Рис. 1.*** *Пример амплификации мультиплекса по пяти микросателлитным локусам у двух особей сибирского осетра на приборе капиллярного электрофореза ABI 3130.*

ном органе СИТЕС в отношении осетровых видов рыб. Она является основным инструментом в определении чистых видов и гибридов осетровых, внедрена и активно используется в трех молекулярно-генетических лабораториях, занимающихся генетикой осетровых в России (в институтах ФГБНУ «АзНИИРх», ФГБНУ «КаспНИИРх», ФГБОУ ВО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья»).

Исследования характера наследования и плоидности микросателлитных локусов легли в основу разработанной авторами программы TPA v.2 (Tetraploid parentage analysis), которая позволяет произвести идентификацию молоди осетровых к конкретной паре ранее генотипированных производителей. Данный метод идентификации происхождения внедрен в программу генетического мониторинга искусственного воспроизводства осетровых Каспийского бассейна, осуществляемого совместно научными институтами Росрыболовства и осетровыми рыборазводными заводами (ОРЗ) ФГБУ «Главрыбвод» Астраханской области. В рамках данной программы ежегодно, в течение ряда последних лет, проводится генотипирование всех производителей русского осетра, участвующих в нерестовой кампании на всех шести ОРЗ Астраханской области. Одновременно в ходе весенней нерестовой кампании фиксируются схемы скрещиваний (сперма какого самца использовалась при оплодотворении каких самок).

Учетные траловые съемки молоди осетровых на нагульных кормовых мелководьях Каспийского моря, проводимые ежегодно в сентябре Каспийским филиалом ФГБНУ «ВНИРО», позволяют с использованием микросателлитного генотипирования собранной в рейсе рыбы и идентификации родительсткой пары в программе TPA провести количественную оценку скатившихся из Волги и перешедших на активное питание мальков, оценить темпы роста и смертности молоди осетровых в первые годы жизни. В ходе данных работ показана высокая доля молоди осетровых заводского происхождения (для русского осетра – до 78%), а также разработано научное обоснование для оптимизации искусственного воспроизводства путем выпуска укрупненной (более 6 г) в сравнении с выпускаемой сейчас стандартной (2–3 г) навеской. Данные рекомендации учтены в находящейся сейчас в процессе согласования новой редакции приказа Минсельхоза №25 от 30.01.2015 г., регламентирующего работу предприятий по искусственному воспроизводству водных биоресурсов, в том числе и осетровых рыборазводных заводов. Результаты исследования характера наследования микросателлитных локусов, выполненные в рамках данного проекта, также вошли в диссертационную работу А.Е. Барминцевой [29].

**Разработка тест-системы для идентификации осетровых гибридного происхождения**

Видовая идентификация черной икры и другой продукции из осетровых имеет первостепенное значение в целях мониторинга торговли аквакультурной продукцией и борьбы с реализацией незаконно добытых (браконьерских) уловов. До настоящего времени существует система видовой идентификации продукции из осетровых, основанная на ПЦР с видоспецифичными праймерами на контрольный участок митохондриальной ДНК, принятая в нескольких ДНК-лабораториях при национальных научных органах CITES [30]. Однако массовое развитие аквакультурного осетроводства привело к появлению значительной доли икры и осетрины гибридного происхождения, и тем самым идентификация продукции только по митохондриальным маркерам становится недостаточной и требуется разработка тест-систем, позволяющих идентифицировать как особей гибридного происхождения, так и продукцию от этих особей.

**Разработка тест-системы для идентификации белуги и гибридов на основании ядерных маркеров**

Высокая цена икры белуги, частое использование икры, полученной от гибридных форм и выдаваемой за наиболее дорогостоящую икру белуги, определяют необходимость разработки ядерных ДНК-маркеров на этот вид.

В ходе анализа транскриптома осетров и последующего секвенирования ядерных генов нами были получены последовательности интрона 166 рибосомального белка S6 (RPS6). В одном из паралогичных кластеров нами выявлен видоспецифичный однонуклеотидный полиморфизм (SNP), характерный только для белуги, что позволило разработать тест-систему, основанную на идентификации этого полиморфизма в тестируемой продукции.


DOI: 10.22204/2410-4639-2020-106-02-78-87 № 2 (106) апрель–июнь 2020 г.

Нами были разработаны праймеры INT166-F 5'-TTCATGGGGAAACCCT GCTT3' и INT166-R 5'-ATCCTCTGG GTGAGGAGTG-3', базирующиеся на краях экзонов и амплифицирующие полную последовательность интрона.

Был разработан SNP-специфичный праймер INT166_huso-F 5'-CATAAC ATTGCACTGAATGTTATA-3', позволяющий (совместно с INT166_group A_R 5'-CTTTCGTTGATTTAGGGAA ATGGT3') получить продукт только при наличии в тестируемом образце ДНК белуги. Проведенная валидация тест-системы на 386 образцах осетровых, относящихся к 11 видам (все виды осетровых, использующиеся в настоящее время в аквакультуре) показала высокую видоспецифичность и достоверность разработанного метода; результаты опубликованы [31].

**Разработка тест-системы идентификации калуги, амурского осетра и их гибридов с использованием SNP-маркеров**

Истощение запасов осетровых Каспийского моря привело к тому, что браконьерский промысел переместился в бассейн реки Амур и икра амурского осетра и калуги стала поступать по тем же путям сбыта, ранее налаженным нелегальными торговцами для реализации браконьерской продукции из Каспия. Кроме того, бурное развитие аквакультуры осетровых в Китае привело к перепроизводству и попаданию больших партий дешевой китайской аквакультурной икры на российский рынок, часто перепакованной с указанием на российское аквакультурное происхождение. Одной из наиболее популярных форм осетровых является гибрид калуги и амурского осетра. Хотя определение чистых видов давно налажено с использованием митохондриальных маркеров, видовая идентификация гибридной продукции возможна только с использованием маркеров, локализованных в ядерной ДНК. Ранее нами был разработан метод идентификации гибридов по присутствию характерных аллелей в панели из шести тетраплоидных микросателлитных локусов, однако данная панель не во всех случаях позволяла идентифицировать гибриды между этими видами [32]. В связи с этим нами была предпринята попытка разработки тест-системы для идентификации амурского осетра, калуги и их гибрида с использованием SNP-маркеров.

Координаты интронных участков рибосомального гена L8 (ген RPL8) были выявлены путем сравнения последовательностей, полученных при анализе транскриптома осетра и интрон-экзонной структуры этого гена у костистых рыб – данио (*Danio rerio*) и фугу (*Takifugu rubripes*). Были составлены праймеры, фланкирующие интроны 4 и 5 RP4L8_F – RP4L8_R (GAAAG TAATCTCCTCTGCCAAC – AATACGACCACCACCAG CAA) и RP5L8_F RP5L8_R (GTCCGTGGTGTGGCTAT GAA – AATGTGCTGATGGTTACCACC), получены последовательности интронов и проведен поиск диагностических однонуклеотидных полиморфизмов. На интроне 4 выявлен SNP, характерный только для калуги, и разработаны SNP-специфичные праймеры RP4L8_Hda u_F (CAAGTTCAGAACACAAACAAAGGA) и обратный праймер RP4L8_Hdau_R (TGGACTATTTTCTC AAGACAAATGC). В интроне 5 этого же гена был выявлен однонуклеотидный полиморфизм, характерный для амурского осетра, и были созданы праймеры, предположительно специфичные для этого вида: RP5L8_ groupA_F (TCCGTGGTGTGGCTATGATT) и обратный RP5L8_Asch_R (AGTGCAATAAACTACTTCTGTG). Использование данных праймеров предполагает наличие ПЦР-продукта длиной 213 пар оснований (п. о.) для ДНК калуги и 146 п. о., если присутствует ДНК амурского осетра.

Для верификации тест-системы мы провели ПЦР-амплификацию с разработанными праймерами на 176 образцах калуги, 332 образцах амурского осетра и 31 образце икры гибрида этих двух видов. Кроме того, новая тест-система была апробирована на 317 особях, принадлежащих к 10 видам осетровых (65 *Huso huso,* 38 *Acipencer gueldenstaedtii,* 5 *A. persicus,* 52 *A. baerii,* 36 *A. naccarii,* 11 *A. transmontanus,* 40 *A. fulvescens,* 26 *A. stellatus,* 15 *A. sinensis* и 29 *A. ruthenus*). Одновременно была проведена диагностика этих же образцов с применением анализа полиморфизма микросателлитных локусов [32]. Результаты массового анализа показали высокую, хотя и не 100% достоверность определения видовой принадлежности. Также нами было показано, что ни по одному из маркеров на калугу и амурского осетра нет полной видоспецифичности и что каждый маркер, хоть и с низкой частотой, но встречается в другом виде. Учитывая, что, согласно реконструкции филогенетических отношений по митохондриальной ДНК, калуга и амурский осетр не являются сестринскими видами, присутствие маркеров другого вида говорит о посто-

янной природной гибридизации, происходившей в прошлом и, возможно, продолжающейся в настоящее время. Так как оба вида входят в программу искусственного воспроизводства и ежегодно на Анюйском и Владимирском осетровых рыборазводных заводах (ФГБНУ «Амуррыбвод») получают и выпускают в реку до 10 млн штук молоди, генетическая верификация производителей является особенно актуальной. Нами было проведено генотипирование всех производителей на этих двух заводах, использованных в получении потомства в 2015 и 2016 гг. (эти особи вошли в число выборок по тестированию тест-системы), и были составлены рекомендации по поддержанию видовой чистоты ремонтно-маточных стад калуги и амурского осетра; результаты разработки тест-системы опубликованы [33].

### Разработка тест-системы идентификации сибирского и русского осетров и гибридов с использованием SNP-маркеров

В ходе проведенного в рамках другого проекта ddRAD секвенирования сибиркого осетра, белуги и стерляди [34] был выявлен анонимный SNP-маркер, обнаруженный только у сибирского осетра, но имеющий альтернативный аллель у двух других видов. Нами были разработаны аллель-специфичные праймеры на данный SNP и проведена верификация с целью выявления видоспецифичности данного однонуклеотидного полиморфизма.

По результатам тестирования более 600 особей 12 видов (*Acipenser baerii, A. gueldenstaedtii, A. ruthenus, A. schrenckii, A. stellatus, A. transmontanus, A. persicus, Huso huso, H. dauricus, Acipencer naccarii, A. fulvescens* и *A. sinensis*) разработанные нами праймеры 395_ABCCACAAAACAACAAAACATATGGAG и 395_uni CCTTGGGCTAGTCTTCATGCC давали видоспецифичный ПЦР-продукт только у сибирского и русского осетров, при этом амплификация у других видов не происходила. Эти данные позволяют расширить используемую панель диагностических локусов для идентификации межвидовых гибридов осетровых с целью контроля оборота черной икры на международном рынке и контроля соблюдения конвенции СИТЕС в отношении торговли продукцией из осетровых; результаты этой работы также опубликованы [35].

## Литература


1. ***L. Grande, W.E. Bemis***
   *J. Vertebr. Paleontol.*, 1991, **11**, Suppl. 1, 1.
   DOI: 10.1080/02724634.1991.10011424.
2. ***W.E. Bemis, E.K. Findeis, L. Grande***
   *Env. Biol. Fish*., 1997, **48**, 25. DOI: 10.1023/A:1007370213924.
3. ***Р.П. Ходоревская, А.А. Романов***
   В *Сб. Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития: Материалы докл. IV Межд. научно-практической конференции (РФ, Астрахань, 13–15 марта 2006 г.),* РФ, Москва, Изд-во ВНИРО, 2006, с. 12–15.
4. ***Г.М. Палатников, Р.Ю. Касимов***
   *Осетровые – современники динозавров*, Азерб. Респ., Баку, 2008, 70 с.
5. ***C. Raymakers***
   *J. Appl. Ichthyol*., 2006, **22**(1), 53.
   DOI: 10.1111/j.1439-0426.2007.00929.x.
6. ***C. Raymakers, C. Hoover***
   *J. Appl. Ichthyol*., 2002, **18**(4–6), 629.
   DOI: 10.1046/j.1439-0426.2002.00398.x.
7. ***R. DeSalle, G. Amato***
   *Nature Rev. Genet*., 2004, **5**, 702. DOI: 10.1038/nrg1425.
8. ***M. Lanfredi, L. Congiu, M.A. Garrido-Ramos, R. de la Herran, M. Leis, M. Chicca, R. Rossi, J. Tagliavini, C. Ruiz Rejon, M. Ruiz Rejon, F. Fontana***
   *Chromosome Res*., 2001, **9**(1), 47. DOI: 10.1023/a:1026739616749.
9. ***R. de la Herran, F. Fontana, M. Lanfredi, L. Congiu, M. Leis, R. Rossi, C. Ruiz Rejon, M. Ruiz Rejon, M.A. Garrido-Ramos***
   *Mol. Biol. Evol.*, 2001, **18**(3), 432.
   DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003820.
10. ***J. Krieger, P.A. Fuerst***
    *Mol. Biol. Evol*., 2002, **19**(6), 891.
    DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004146.
11. ***V.J. Birstein, A.I. Poletaev, B.F. Goncharov***
    *Cytometry*, 1993, **14**(4), 377. DOI: 10.1002/cyto.990140406.
12. ***A. Ludwig, N.M. Belfiore, C. Pitra, V. Svirsky, I. Jenneckens***
    *Genetics,* 2001, **158**(3), 1203.
13. ***F. Fontana, L. Zane, A. Pepe, L. Congiu***
    В *Fish Cytogenetics,* Eds E. Pisano, C. Ozof-Costaz, F. Foresti, B.G. Kapoor, USA, NH, Enfield, Science Publishers Inc., 2007, p. 385.
14. ***V.P. Vasil'ev***
    В *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons. Fish & Fisheries Series*, FRG, Dordrecht, Springer Publ., 2009, **29**, 97. DOI: 10.1007/978-1-4020-8437-9_6.
15. ***S.R. Fain, D.J. Straughan, B.C. Hamlin, R.M. Hoesch, J.P. LeMay***
    *Conserv. Genet*., 2013, **14**(4), 855. DOI: 10.1007/s10592-013-0481-z.
16. ***И. Сэффрон***
    *Икра. Светлое прошлое и темное будущее великого деликатеса*, РФ, Москва, Изд. «КоЛибри», 2006, 360 с.
17. ***B.K. Mable , M.A. Alexandrou, M.I. Taylor***
    *J. Zool*., 2011, **284**(3), 151. DOI: 10.1111/j.1469-7998.2011.00829.x.
18. ***V.J. Birstein, R. Hanner, R. DeSalle***
    В *Sturgeon Biodiversity and Conservation*, FRG, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 127.
19. ***Н.И. Николюкин***
    *Отдаленная гибридизация осетровых и костистых рыб (теория и практика)*, СССР, Москва, Пищевая промышленность, 1972, 335 с.
20. ***V.P. Vasil'ev, E.D. Vasil'eva, S.V. Shedko, G.V. Novomodny***
    *J. Ichthyol.*, 2010, **50**(10), 950. DOI: 10.1134/S0032945210100048.
21. ***H. Ellegren***
    *Nat. Rev. Genet*., 2004, **5**(6), 435. DOI: 10.1038/nrg1348.
22. ***J.M. Wright***
    В *Molecular Biology Frontiers, Ser. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol. 2,* NL, Amsterdam, Elsevier Sci. Publ., 1993, p. 58.
23. ***Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова***
    *Генетика*, 2002, **38**(9), 1173.
24. ***B. May, C.C. Krueger, H.L. Kincaid***
    *Can. J. Fish. Aquat. Sci*., 1997, **54**(7), 1542. DOI: 10.1139/cjfas-54-7-1542.

25. ***J. Rajkov, Z. Shao, P. Berrebi***
*J. Hered.*, 2014, **105**(4), 521. DOI: 10.1093/jhered/esu027.
26. ***J.D. Pyatskowit, C.C. Krueger, H.L. Kincaid, B. May***
*Genome*, 2001, **44**(2), 185. DOI: 10.1139/g00-118.
27. ***D. Fopp-Bayat***
*Aquacult. Res.*, 2008, **39**(16), 1787.
DOI: 10.1111/j.1365-2109.2008.02059.x.
28. ***M. Havelka, M. Hulák, D.A. Bailie, P.A. Prodöhl, M. Flajšhans***
*J. Appl. Ichthyol.*, 2013, **29**(4), 704. DOI: 10.1111/jai.12224.
29. ***А.Е. Барминцева***
*Автореф. дис. канд. биол. наук*, ВНИРО, РФ, Москва, 2018, 26 с.
(http://idbras.ru/dis/16042018/avtoreferat.pdf).
30. ***Н.С. Мюге, А.Е. Барминцева, С.М. Расторгуев, В.Н. Мюге, В.А. Барминцев***
*Генетика*, 2008, **44**(7), 913.
31. ***E. Boscari, N. Vitulo, A. Ludwig, C. Caruso, N.S. Mugue, R. Suciu, D.F. Onara, C. Papetti, I.A.M. Marino, L. Zane, L. Congiu***
*Food Control*, 2017, **75**, 145.
DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.11.039.
32. ***А.Е. Барминцева, Н.С. Мюге***
*Генетика*, 2013, **49** (9), 1093.
DOI: 10.7868/S0016675813090038.
33. ***E. Boscari, A. Barmintseva, S. Zhang, H. Yue, C. Li, S.V. Shedko, D. Lieckfeldt, A. Ludwig, Q.W. Wei, N.S. Mugue, L. Congiu***
*Food Control*, 2017, **82**, 243.
DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.07.001.
34. ***M. Havelka, T. Fujimoto, S. Hagihara, S. Adachi, K. Arai***
*Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1694. DOI: 10.1038/s41598-017-01768-3.
35. ***M. Havelka, E. Boscari, A. Sergeev, N. Mugue, L. Congiu, K. Arai***
*Anim. Genet.*, 2019, **50**, 115. DOI: 10.1111/age.12733.


English

# Genomic Research for Sturgeon Conservation: Analysis of the Inheritance of Polyploid Loci and the Development of a Marker Panel to Identify Sturgeon Hybrids and Their Products*


***Nikolai S. Mugue***
Russian Federal Research Institute
of Fisheries and Oceanography
17 V. Krasnoselskaya Str., Moscow, 107140, Russia
Koltzov Institute of Developmental Biology
26 Vavilov Str., Moscow, 119034, Russia
mugue@mail.ru

***Anna E. Barmintseva***
Russian Federal Research Institute
of Fisheries and Oceanography
17 V. Krasnoselskaya Str.,Moscow, 107140, Russia
Koltzov Institute of Developmental Biology
26 Vavilov Str., Moscow, 119034, Russia
bae69@mail.ru


## Abstract


Analysis of allelic inheritance of polymorphic microsatellite loci was carried out in the study of experimental crosses to asses ploidy level and degree of diploidization of the genomes for high- and low-chromosome number sturgeon species. Species identification markers for Beluga *(Huso huso)* and its hybrids (the most commercially valuable sturgeon products), Amur sturgeon *(Acipencer schrenckii)* and Kaluga *(Huso dauricus)* hybrid (nowadays the most popular hybrid, massively farmed in China and supplied to the Russian market) are presented, as well as a nuclear genetic marker for identification Russian *(Acipencer gueldenstaedtii)* and Siberian *(A. baerii)* sturgeons in its hybrids. Results of the presented research have been implemented in the Program for genetic monitoring of sturgeon restocking, conducted by Federal Fishery Agency, as well as in the practice of DNA-based species identification of caviar and other sturgeon products from both pure species and hybrids grown in sturgeon fish farms.



**Keywords:** sturgeons, polyploidy, DNA-identification.

**The work was financially supported by RFBR (project 15-29-02766).*


## Images & Tables

***Table 1.*** *Characterization of tested cross-breedings*

| № | Female | Ploidy | Male | Ploidy | Number of larvae | Ploidy |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Acipencer baerii* | 4*n* | *A. baerii (облученный)* | – | 48 | 2*n* |
| 2 | *A. baerii* | 4*n* | *A. baerii* | 4*n* | 48 | 4*n* |
| 3 | *A. baerii* | 4*n* | *A. ruthenus* | 2*n* | 93 | 3*n* |
| 4 | *A. gueldenstaedtii* | 4*n* | *A. gueldenstaedtii* | 4*n* | 8 | 4*n* |
| 5 | *A. ruthenus* | 2*n* | *Huso huso* | 2*n* | 14 | 2*n* |
| 6 | *A. stellatus* | 2*n* | *A. ruthenus* | 2*n* | 14 | 2*n* |
| 7 | *A. stellatus* | 2*n* | *A. stellatus* | 2*n* | 11 | 2*n* |
| 8 | *A. ruthenus* | 2*n* | *H. huso* | 2*n* | 14 | 2*n* |

***Table 2.*** *The inheritance pattern of the tested loci*

| Loci | Null allele | Locus ingeritance pattern |
|---|---|---|
| AoxD161 | – | Tetrasomal diploidized |
| Afug63 | + | Tetrasomal diploidized |
| Afug41 An20 AoxD165 Afug51 AoxD234 | – | Tetrasomal independent |
| Afug67 | + | Tetrasomal independent |
| Afug65 Ape32 | – | Octasomal independent |
| Afug113 An40 | + | Octasomal diploidized |
| Afug112 | + | Diploid |
| Afug135 | – | At different stages in different species |
| Afug95 Afug174 | – | Non-polymorphic loci |

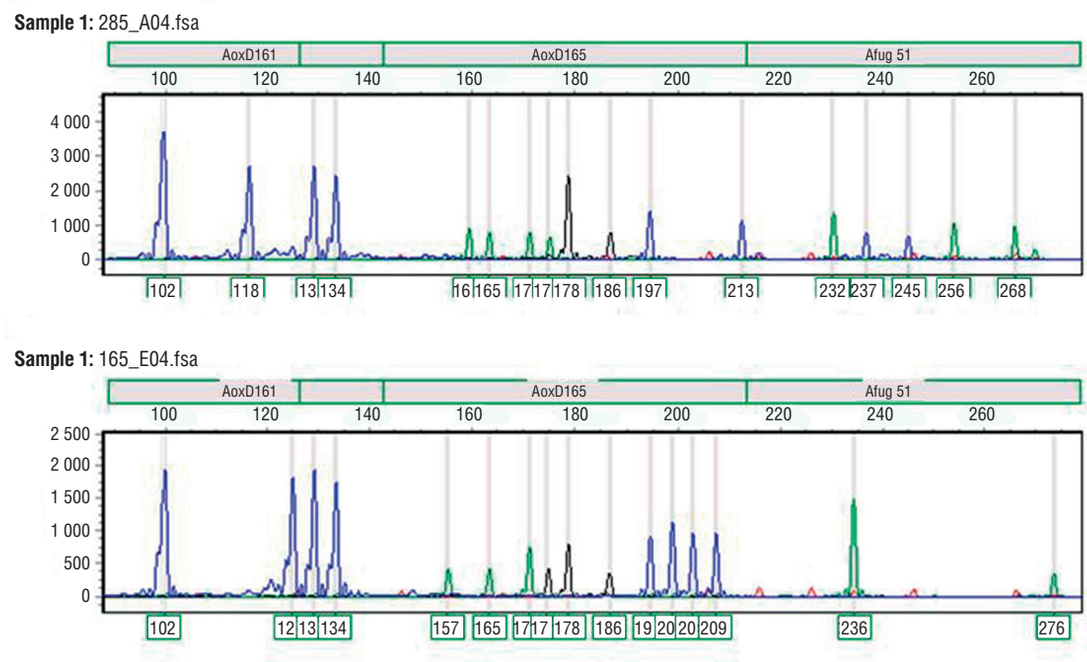



***Fig. 1.*** *Example of allele report for multiplex PCR with five microsatellite loci for two Siberian Sturgeon specimens (AB3130 sequencer).*

## References


1. ***L. Grande, W.E. Bemis***
   *J. Vertebr. Paleontol.*, 1991, **11**, Suppl. 1, 1.
   DOI: 10.1080/02724634.1991.10011424.
2. ***W.E. Bemis, E.K. Findeis, L. Grande***
   *Env. Biol. Fish.*, 1997, **48**, 25. DOI: 10.1023/A:1007370213924.
3. ***R.P. Khodorevskaya, A.A.Romanov***
   In *Proc. IV Int. Conf. "Sturgeon aAquaculture: Achievments and Perspectives for Development" (RF, Astrakhan, 13–15 March, 2006),* RF, Moscow, VNIRO Publ., 2006, pp. 12–15 (in Russian).
4. ***G.M. Palatnikov, R.U. Kasimov***
   *Osetrovye – sovremenniki dinozavrov [Sturgeons – Contemporaries of Dinosaurs]*, Rep. Azerb., Baku, 2008, 70 p. (in Russian).
5. ***C. Raymakers***
   *J. Appl. Ichthyol.*, 2006, **22**(1), 53.
   DOI: 10.1111/j.1439-0426.2007.00929.x.
6. ***C. Raymakers, C. Hoover***
   *J. Appl. Ichthyol.*, 2002, **18**(4–6), 629.
   DOI: 10.1046/j.1439-0426.2002.00398.x.
7. ***R. DeSalle, G. Amato***
   *Nature Rev. Genet.*, 2004, **5**, 702. DOI: 10.1038/nrg1425.
8. ***M. Lanfredi, L. Congiu, M.A. Garrido-Ramos, R. de la Herran, M. Leis, M. Chicca, R. Rossi, J. Tagliavini, C. Ruiz Rejon, M. Ruiz Rejon, F. Fontana***
   *Chromosome Res.*, 2001, **9**(1), 47. DOI: 10.1023/a:1026739616749.

9. ***R. de la Herran, F. Fontana, M. Lanfredi, L. Congiu, M. Leis, R. Rossi, C. Ruiz Rejon, M. Ruiz Rejon, M.A. Garrido-Ramos***
*Mol. Biol. Evol.,* 2001, **18**(3), 432.
DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003820.
10. ***J. Krieger, P.A. Fuerst***
*Mol. Biol. Evol*., 2002, **19**(6), 891.
DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004146.
11. ***V.J. Birstein, A.I. Poletaev, B.F. Goncharov***
*Cytometry*, 1993, **14**(4), 377. DOI: 10.1002/cyto.990140406.
12. ***A. Ludwig, N.M. Belfiore, C. Pitra, V. Svirsky, I. Jenneckens***
*Genetics,* 2001, **158**(3), 1203.
13. ***F. Fontana, L. Zane, A. Pepe, L. Congiu***
In *Fish Cytogenetics, Eds* E. Pisano, C. Ozof-Costaz, F. Foresti, B.G. Kapoor, USA, NH, Enfield, Science Publishers Inc., 2007, p. 385.
14. ***V.P. Vasil'ev***
In *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons. Fish & Fisheries Series*, FRG, Dordrecht, Springer Publ., 2009, **29**, 97.
DOI: 10.1007/978-1-4020-8437-9_6.
15. ***S.R. Fain, D.J. Straughan, B.C. Hamlin, R.M. Hoesch, J.P. LeMay***
*Conserv. Genet.*, 2013, **14**(4), 855. DOI: 10.1007/s10592-013-0481-z.
16. ***I. Saffron***
*Caviar: The Strange History and Uncertain Future of the World's Most Coveted Delicacy*, USA, Broadway, 2002, 288 pp.
17. ***B.K. Mable , M.A. Alexandrou, M.I. Taylor***
*J. Zool.*, 2011, **284**(3), 151.
DOI: 10.1111/j.1469-7998.2011.00829.x.
18. ***V.J. Birstein, R. Hanner, R. DeSalle***
In *Sturgeon Biodiversity and Conservation*, FRG, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 127.
19. ***N.I. Nikoljukin***
*Otdalennaya gibridizatsia osetrovykh i kostistykh ryb (teoria i praktika) [Distant Hybridization in Acipenseridae and Teleostei (Theory and Practice)]*, USSR, Moscow, 1972, 335 pp. (in Russian).
20. ***V.P. Vasil'ev, E.D. Vasil'eva, S.V. Shedko, G.V. Novomodny***
*J. Ichthyol.*, 2010, **50**(10), 950. DOI: 10.1134/S0032945210100048.
21. ***H. Ellegren***
*Nat. Rev. Genet.*, 2004, **5**(6), 435. DOI: 10.1038/nrg1348.
22. ***J.M. Wright***
In *Molecular Biology Frontiers, Ser. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol. 2,* NL, Amsterdam, Elsevier Sci. Publ., 1993, p. 58.
23. ***Y.P. Altukhov, E.A. Salmenkova***
*Rus. J. Genet.,* 2002, **38,** 989.
DOI: 10.1023/A:1020288812170.
24. ***B. May, C.C. Krueger, H.L. Kincaid***
*Can. J. Fish. Aquat. Sci*., 1997, **54**(7), 1542.
DOI: 10.1139/cjfas-54-7-1542.
25. ***J. Rajkov, Z. Shao, P. Berrebi***
*J. Hered*., 2014, **105**(4), 521. DOI: 10.1093/jhered/esu027.
26. ***J.D. Pyatskowit, C.C. Krueger, H.L. Kincaid, B. May***
*Genome*, 2001, **44**(2), 185. DOI: 10.1139/g00-118.
27. ***D. Fopp-Bayat***
*Aquacult. Res*., 2008, **39**(16), 1787.
DOI: 10.1111/j.1365-2109.2008.02059.x.
28. ***M. Havelka, M. Hulák, D.A. Bailie, P.A. Prodöhl, M. Flajšhans***
*J. Appl. Ichthyol*., 2013, **29**(4), 704. DOI: 10.1111/jai.12224.
29. ***A.E. Barmintseva***
*PhD Thes. (Biology) [Dissertation for the Degree of a Candidate of Biol. Sci.]*, VNIRO, RF, Moscow, 2018, 26 p. (in Russian).
30. ***N.S. Mugue, A.E. Barmintseva, S.M. Rastorguev, V.N. Mugue, V.A. Barmintsev***
*Rus. J. Genet.,* 2008, **44**(7), 793. DOI: 10.1134/S1022795408070065.
31. ***E. Boscari, N. Vitulo, A. Ludwig, C. Caruso, N.S. Mugue, R. Suciu, D.F. Onara, C. Papetti, I.A.M. Marino, L. Zane, L. Congiu***
*Food Control*, 2017, **75**, 145.
DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.11.039.
32. ***A.E. Barmintseva, N.S. Mugue***
*Rus. J. Genet.,* **49** (9), 950. DOI: 10.1134/S1022795413090032.
33. ***E. Boscari, A. Barmintseva, S. Zhang, H. Yue, C. Li, S.V. Shedko, D. Lieckfeldt, A. Ludwig, Q.W. Wei, N.S. Mugue, L. Congiu***
*Food Control*, 2017, **82**, 243. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.07.001.
34. ***M. Havelka, T. Fujimoto, S. Hagihara, S. Adachi, K. Arai***
*Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1694. DOI: 10.1038/s41598-017-01768-3.
35. ***M. Havelka, E. Boscari, A. Sergeev, N. Mugue, L. Congiu, K. Arai***
*Anim. Genet.,* 2019, **50**, 115.
DOI: 10.1111/age.12733.