МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЖИВОТНОВОДСТВА – ВИЖ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Л.К. ЭРНСТА»

На правах рукописи

Никипелова Амина Кумаровна

ХАРАКТЕРИСТИКА НАСЛЕДОВАНИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ У ДОМЕСТИЦИРОВАННЫХ ТЕТРАПЛОИДНЫХ ВИДОВ НА ПРИМЕРЕ СИБИРСКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER BAERII* BRANDT, 1869

Специальность: 1.5.7 Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
ДОЦЕВ Арсен Владимирович

Дубровицы-2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ ……..		4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ		
1.1	Биологические особенности сибирского осетра *(Acipenser baerii,* Brandt 1869) …….	15
1.2	Ареал обитания и экологические особенности сибирского осетра ……..	17
1.3	Современное состояние и перспективы развития осетроводства …….	19
1.4	Разведение сибирского осетра в аквакультуре ……	23
1.5	Филогения и эволюционная история сибирского осетра……	25
1.6	Структура и особенности генома осетровых рыб……	28
1.7	Микросателлитные ДНК-маркеры: характеристика, свойства и применение в генетике……...	33
1.8	Применение микросателлитных маркеров у представителей осетровых……	35
1.9	Изучение генетического разнообразия популяций сибирского осетра ……..	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ		
2.1	Материалы исследований …….	45
2.2	Методы исследований……	48
2.2.1	Подготовка проб…….	48
2.2.2	Выделение и подготовка ДНК……...	48
2.2.3	Подбор микросателлитных маркеров……...	49
2.2.4	Критерии выбора микросателлитных локусов……	50
2.2.5	Подбор температуры отжига…….	51
2.2.6	Состав реакционной смеси……	52
2.2.7	Фрагментный анализ…….	54
2.2.8	Статистическая обработка…….	55
2.2.9	Определение дозы аллелей в микросателлитных локусах…….	56
2.2.10	Стандартизация длин микросателлитных локусов…….	58
2.2.11	Методика установления характера наследования микросателлитных локусов у сибирского осетра……...	62
2.2.12	Оценка показателей роста у экспериментальной группы сибирского осетра ……	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ		

3.1	Разработка мультиплексной тест-системы микросателлитных локусов для генетической паспортизации сибирского осетра……..	67
3.2	Разработка метода стандартизации длин аллелей микросателлитных локусов ……..	72
3.3	Анализ характера наследования микросателлитных локусов……	78
3.4	Установление родства в экспериментальных семьях на основе микросателлитного анализа……..	83
3.5	Характеристика генетического разнообразия ремонтно-маточных стад сибирского осетра ленской популяции……...	87
3.5.1	Влияние индивидуальной гетерозиготности на показатели роста ленского осетра ……..	93
3.6	Генетическая дифференциация аквакультурных групп сибирского осетра различного географического происхождения……...	97
3.7	Сравнительный анализ генетического полиморфизма сибирского осетра с другими представителями семейства Acipenseridae……..	99
3.8	Составление индивидуальных и групповых генетических паспортов для сибирского осетра ленской популяции, разводимого в условиях аквакультуры…….	112
	ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ……..	115
	ВЫВОДЫ……	121
	РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ……	123
	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ…….	124
	Список использованной литературы……	125
	Приложение 1. ……	144
	Приложение 2. ……	156
	Приложение 3. ……	160

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В условиях глобального сокращения численности естественных популяций осетровых рыб, вызванного антропогенными факторами – строительством гидроэлектростанций, нарушающим пути нерестовых миграций, загрязнением среды обитания и браконьерством, аквакультура приобретает важное значение как альтернативный источник ценной пищевой продукции (Vasilyeva L. M. et al., 2019; Chandra G., Fopp-Bayat D., 2021; Breve N. W. et al., 2022.). Сибирский осетр занимает особое положение среди представителей семейства Acipenseridae, являясь одним из наиболее перспективных объектов товарного выращивания как в России, так и за рубежом (Bronzi et al., 2011), что обусловлено его высокими темпами роста, адаптационным потенциалом и качеством продукции (Рубан И. Г., 2019). Вид населяет обширные территории, включая крупные реки Сибири (Обь, Енисей, Лена) и озеро Байкал. Несмотря на столь широкое распространение, численность вида критически сократилась. В настоящее время сибирский осетр отнесен Международным союзом охраны природы (МСОП) к категории «Critically Endangered» (находящиеся под критической угрозой исчезновения) в соответствии с классификацией IUCN 3.1. (Рубан Г. И., Мюге Н. С., 2022). Формирование одомашненных стад сибирского осетра в России началось в 1981 году на Конаковском осетровом заводе (Тверская область), где впервые было создано маточное стадо ленской популяции (Малютин В. С., Рубан И. Г., 2009). Это достижение позволило предприятию стать ведущим поставщиком племенного материала, и на сегодняшний день ленский осетр составляет основу осетроводства во многих странах. В России зарегистрированы две породы ленского осетра – «Одомашненная форма» (1993 г.) (https://gossortrf.ru) и выведенная на ее основе порода «Лена-1» (2008 г.) (https://gossortrf.ru). Таким образом, практически все одомашненное поголовье сибирского осетра ленской популяции ведет свое происхождение от ограниченного числа основателей. Если на начальных этапах ремонтно- маточные стада пополнялись за счет особей из природных популяций (Williot P. et al., 2018), то в последние годы на заводах все чаще в качестве производителей используется рыба из собственного

репродуктивного материала, что неизбежно создает риски близкородственного скрещивания и снижения генетического разнообразия.

Сибирский осетр, как и многие виды современных осетровых, является полиплоидом. Даже виды с наименьшим количеством хромосом, такие как стерлядь, севрюга, белуга, шип, пережили в прошлом этап удвоения генома, а сейчас являются функциональными диплоидами (Havelka M. et al., 2016). Сама полиплоидизация – это крупное эволюционное событие, приводящее к репродуктивной изоляции, образованию новых видов, изменению фенотипа. В геноме тетраплоидных осетровых начинают происходить обратные изменения – происходит процесс диплоидизации (из-за накопления в хромосомах мутаций, начинается разбивка четырех гомологичных хромосом обратно на пары), из-за которой при выполнении различных генетических исследований можно неверно интерпретировать полученные результаты, например, увидеть потерю генетического разнообразия, которого на самом деле может не быть. У многих локусов возможно не равновероятное наследование аллельных вариантов. Эта фундаментальная особенность сибирского осетра как функционального тетраплоида (кариотип около 240-250 хромосом) требует применения специализированных подходов при генетическом анализе.

Важную роль среди ДНК-маркеров, используемых в генетических исследованиях диких и аквакультурных стад осетровых рыб, играют микросателлитные локусы (STR- короткие тандемные повторы, SSR- простые повторы последовательностей) (Kalia R. K. et al., 2011). Микросателлиты представляют собой тандемные повторы длиной 1-6 нуклеотидов, широко распространенные в ядерных геномах большинства организмов и обладающие высоким уровнем полиморфизма. Именно микросателлиты являются наиболее удобными генетическими маркерами для определения уровня плоидности и характера наследования благодаря разнообразию аллелей и высокому полиморфизму. Длина микросателлитного локуса обычно составляет от 5 до 40 повторов, при этом наиболее часто в молекулярно-генетических исследованиях используются ди-, три- и тетрануклеотидные повторы. Три- и гексануклеотидные

повторы чаще встречаются в кодирующих областях генома, поскольку их длина не приводит к сдвигу рамки считывания (Toth G. et al., 2000). В осетроводстве микросателлитные локусы нашли применение для решения таких задач, как идентификация гибридов (Yang S. et al., 2025), анализ популяционной структуры (Panagiotopoulou H. et al., 2014), а также подтверждение достоверности происхождения (Wang J. et al., 2022).

Характер наследования микросателлитного локуса будет отражать характер наследования хромосомы, на которой он расположен. У тетраплоидных осетровых, представителем которых является сибирский осетр, микросателлитные локусы могут проявлять тетрасомный, дисомный и диплоидизированный тетрасомный характер (Барминцева А. Е., Мюге Н. С., 2018). Каждый тип наследования предполагает свой алгоритм расчета статистических показателей. Игнорирование реального характера наследования используемых маркеров ведет к искажению оценок генетического разнообразия и ошибочным выводам, что особенно критично при мониторинге ремонтно-маточных стад.

Таким образом, несмотря на растущие масштабы аквакультуры сибирского осетра в России, сведения о современном состоянии генетического разнообразия ремонтно-маточных стад различных рыбоводных хозяйств остаются ограниченными. Мониторинг их генетического состояния необходим для грамотной селекционно-племенной работы, снижения рисков инбридинга и сохранения генофонда вида, особенно учитывая, что выращенная на заводах молодь все чаще используется для пополнения природных популяций. Генетическое разнообразие в маточных стадах существенно сокращенно по сравнению с природными популяциями, поэтому разработка эффективных методов его мониторинга приобретает важное значение для устойчивого развития аквакультуры данного вида.

Степень разработанности темы. Теоретической базой для изучения генетической структуры осетровых рыб послужили фундаментальные исследования отечественных и зарубежных авторов. Работы данных исследователей (Birstein V. J., 1993; Ludwing A. et al., 2001; Fontana F., 2002)

позволили сформировать современные представления об эволюционной истории, филогеографии и структурной организации генома представителей семейства Acipenseridae, включая явление полиплоидизации. Значительный вклад в развитие популяционной генетики сибирского осетра, и осетровых в целом, внесли исследования Барминцевой А. Е., Мюге Н. С. и Рубана Г.И., в рамках которых был проведен детальный анализ вариабельности митохондриальной ДНК, охарактеризована генетическая дифференциация природных популяций из различных частей ареала (Оби, Енисея, Лены), а также разработаны первые панели микросателлитных локусов, пригодные для видовой идентификации и популяционного анализа.

В области осетроводства микросателлитные маркеры получили широкое распространение. С их помощью решаются задачи идентификации гибридных форм, подтверждения происхождения и эффективности искусственного воспроизводства. При этом большая часть соответствующих работ базировалась на методических подходах, разработанных для диплоидных организмов, без учета полиплоидной природы осетровых. Вместе с тем, многочисленными кариологическими и молекулярно-цитогенетическими исследованиями установлено, что сибирский осетр является функциональным тетраплоидом, обладающим полисомным (тетрасомным) типом наследования микросателлитных локусов, что требует адаптации стандартных протоколов генотипирования.

Несмотря на длительную историю одомашнивания сибирского осетра и растущие масштабы его аквакультуры в России, исследования аллелофонда ремонтно-маточных стад различных рыбоводных хозяйств остаются ограниченными. В связи с этим недостаточно изученным остается уровень полиморфизма микросателлитных локусов в одомашненных стадах сибирского осетра для грамотной селекционно-племенной работы и сохранения генофонда как для целей товарного выращивания, так и для восстановления естественных популяций.

Объект и предмет исследования. Объектом диссертационного исследования являлись особи сибирского осетра (*Acipenser baerii*) различного

географического происхождения (ленская, обская, енисейская), а также представители других видов семейства Acipenseridae (русский осетр, сахалинский осетр, амурский осетр, калуга, шип, севрюга, белуга, стерлядь), разводимые в условиях аквакультуры в России. Предмет исследования: полиморфизм, характер наследования и информативность микросателлитных локусов, генетическая структура, уровень разнообразия и степень дифференциации исследуемых групп.

Цель и задачи исследования.

Цель работы: разработка и валидация тест-системы микросателлитных маркеров для исследования наследования микросателлитных локусов и оценки генетического разнообразия сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869), разводимого в аквакультуре России.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать тест-систему микросателлитных маркеров для генотипирования сибирского осетра с учетом тетраплоидной природы его генома.

2. Разработать и апробировать метод стандартизации и валидации длин аллелей микросателлитных локусов у сибирского осетра.

3. Определить характер наследования выбранных микросателлитных локусов на экспериментальных группах потомства с известным происхождением.

4. Оценить уровень генетического полиморфизма представителей сибирского осетра из различных рыбоводных хозяйств с использованием созданной панели микросателлитных локусов.

5. Провести сравнительный анализ генетического полиморфизма сибирского осетра с другими представителями семейства Acipenseridae для оценки видоспецифичности используемых микросателлитных маркеров.

Научная новизна работы. Впервые отобраны 12 микросателлитных локусов для достоверного генотипирования сибирского осетра на основе комплексного анализа более 48-ми STR-маркеров с обязательным контролем дозы аллелей. Впервые разработан и апробирован метод стандартизации длин аллелей микросателлитных локусов, основанный на использовании референсных фрагментов ДНК и универсального флуоресцентно-меченого праймера, что

позволяет минимизировать ошибки определения размеров аллелей. Для сибирского осетра описан новый локус *AcR13V* с дисомным типом наследования, что открывает перспективы создания панели микросателлитных маркеров с дисомным наследованием. Такие локусы наиболее удобны для генетического анализа, поскольку большинство стандартных программ ориентированы на диплоидные организмы.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных знаний об организации и эволюции генома у полиплоидных видов. Полученные данные о характере распределения аллелей микросателлитных локусов и особенностях их наследования вносят существенный вклад в понимании механизмов функциональной диплоидизации у представителей семейства Acipenseridae. Разработанная тест-система внедрена в практику работы ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста и может быть использована в рыбоводных хозяйствах для генетической паспортизации, контроля происхождения и подтверждения родственных связей, идентификации видовой принадлежности и выявлении гибридов.

Методология и методы исследования. Методологическая основа работы базируется на принципах популяционной генетики и молекулярной биологии. В ходе выполнения работы были использованы следующие методы: сбор биологических образцов, выделение ДНК, ПЦР (сингл-, мультиплексная, градиентная), электрофорез в агарозном геле, фрагментный анализ на генетическом анализаторе, статистическая обработка данных с применением специализированного программного обеспечения (GeneMarker, STRUCTURE, SPAGeDi, RStudio).

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанная мультиплексная панель из 12-ти микросателлитных локусов, оптимизированная с учетом тетраплоидной природы генома, позволяет достоверно определять количественное соотношение аллелей и является эффективной для генетической паспортизации, оценки разнообразия и контроля происхождения сибирского осетра в аквакультуре.

2. Разработанный метод контроля длин аллелей микросателлитных локусов с использованием фрагментов ДНК известной длины, меченных идентичным флуорофором, позволяет снизить погрешность определения размеров аллелей до 0,2 п.н. и обеспечивает межлабораторную воспроизводимость результатов. Предложенный метод приобретает особую ценность ввиду отсутствия стандартизированных международных панелей для полиплоидных видов осетровых.

3. На основании анализа экспериментальных скрещиваний установлено, что для 10 выбранных микросателлитных локусов: *Agu38, An20, Aru18, As043, Agu37, Ls19, Agu41, Ag18, Ag10, Afu39* не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования, локус *Ag49a*, наследуется по тетрасомному типу, а микросателлитный локус *AcR13V* – по дисомному типу. Выявленный дисомный характер наследования локуса *AcR13V* делает его удобным для достоверного установления родства.

4. Предложенная тест-система на основе 12-ти STR-маркеров позволяет дифференцировать большинство проанализированных представителей семейства Acipenseridae, в том числе выявлять особей гибридного происхождения. Для сахалинского осетра и севрюги выявлены диагностические аллели, что позволяет проводить их видовую идентификацию без применения дополнительных маркеров. В отношении сибирского и русского осетров видоспецифичных аллелей не обнаружено: дифференциация этих видов достигается только при выделении кластеров на основании коэффициента подобия Q, а также анализа главных координат (PCoA). Ввиду значительной генетической близости данных видов требуется подбор более информативных ядерных маркеров, например, на основе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается значительным объемом проанализированного биологического материала (более 400 образцов), использованием сертифицированного оборудования и реактивов, применением

современных методов статистической обработки и воспроизводимости результатов.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 9 конференциях: круглый стол: «День науки в музее. Диалог профессионалов и молодежи». Муниципальное учреждение культуры «Подольский краеведческий музей» (МУК «ПКМ»), г. Подольск, 8 февраля 2023 г.; XVI Международный Биотехнологический Форум «РосБиоТех» «Биотехнологии в России и мире: современные вызовы и перспективные направления развития (к 300-летию Российской академии наук)». Президиум Российской академии наук. 19-20 апреля 2023 г.; III Международная научно-практическая конференция «Развитие и современные проблемы аквакультуры» (АКВАКУЛЬТУРА - 2023). ФГБОУ ВО «Донской Государственный Технический Университет». 4-7 сентября 2023 г.; международная научно-практическая школа-конференция «Генетические технологии в животноводстве- современные траектории в развитии науки и образования», посвященная 150 – летию академика Е.Ф. Лискуна. Федеральный исследовательский центр ВИЖ имени Л.К. Эрнста. 14-17 ноября 2023 г.; международная научно- практическая конференция "Будущее аквакультуры. Прогрессивные биотехнологии". Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и биоинженерии имени Н.И. Вавилова, г. Саратов. 1-2 февраля 2024 г.; международный научный форум «Современные достижения и проблемы разведения, селекции, генетики и биотехнологии в животноводстве», посвященного 95-летию со дня рождения академика Л.К. Эрнста. Федеральный исследовательский центр ВИЖ имени Л.К. Эрнста. Дубровицы. 6-8 октября 2024 г.; молодежная научная конференция: «Исследования молодых ученых в реализации приоритетов научно-технологического развития в области животноводства». Федеральный исследовательский центр ВИЖ имени Л.К. Эрнста. Дубровицы. 9 апреля 2025 г.; международная научная конференция «XI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», посвященная 80-летию Победы в Великой Отечественной Войне». ФГБОУ ВО «Санкт Петербургский

государственный университет ветеринарной медицины» 27-28 ноября 2025 г.; II Молодежная научная конференция: «Исследования молодых ученых в реализации приоритетов научно-технологического развития в области животноводства». Федеральный исследовательский центр ВИЖ имени Л.К. Эрнста. Дубровицы. 25 марта 2026 г.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

В научных изданиях, рекомендованных ВАК и к ним приравненных

1. Бардуков Н.В., **Никипелова А.К.**, Белоус А.А., Зиновьева Н.А. Разработка мультиплексной панели микросателлитов для генетической паспортизации сибирского осетра *(Acipenser baerii)* // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – Т. 58. № 6. – С. 1057-1067. – doi: 10.15389/agrobiology.2023.6.1057rus.

2. **Никипелова А. К.,** Доцев А.В., Бардуков Н.В., Никипелов В.И. Характеристика аллелофонда сибирского осетра *(Acipenser baerii B.),* разводимого на территории России с использованием оптимизированной мультиплексной панели микросателлитных локусов // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2026. – Т. 17, № 1. – С. 42-54. – doi:10.17072/1994-9952-2026-1-42-54.

3. Belous A.A., Otradnov P.I., **Nikipelova A.K**., Bardukov N.V., Nikipelov V.I., Shishanov G.A., Rakova A.S., Ilyushina P.S., Gusev I.V., Zinovieva N.A. Growth and Development Dynamic of the Lena Population Siberian Sturgeon (Acipenser baerii Brandt, 1869) Bred in a Recirculating Aquaculture System. Animals (Basel). 2026 Feb 21;16(4):677. doi: 10.3390/ani16040677. PMID: 41751142; PMCID: PMC12937425.

В иных научных изданиях

4. **Никипелова А.К**., Бардуков Н.В., Доцев А.В., Белоус А.А. Особенности полиморфизма микросателлитных локусов у сибирского осетра ленской популяции, разводимого в индустриальных условиях // Journal of Agriculture and Environment. – 2024. – № 12(52). – doi: 10.60797/JAE.2024.52.11.

5. Бардуков Н. В., **Никипелова А. К.**, Отраднов П. И., Никипелов В.И., Белоус А.А. Определение достоверности происхождения сибирского осетра на основе результатов микросателлитного анализа и коэффициентов генетического

сходства // Животноводство и кормопроизводство. – 2024. – Т. 107, № 4. – С. 106-119. – doi: 10.33284/2658-3135-107-4-106.

6. **Никипелова А. К.,** Бардуков Н.В., Никипелов В.И. Стандартизация анализа STR-маркеров у сибирского осетра (*Acipenser baerii*): разработка референсной системы контроля длин аллелей // Ветеринария и кормление. – 2025. – № 5. – С. 78-83. – doi: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2025-5-17.

Публикации в сборниках трудов конференций

7. **Никипелова А. К.,** Бардуков Н. В., Доцев А. В., Никипелов В. И. Генетическая паспортизация сибирского осетра (Acipenser baerii) на основе STR-маркеров // Исследования молодых ученых в реализации приоритетов научно-технологического развития в области животноводства: Сборник тезисов докладов молодежной научной конференции, ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 09 апреля 2025 года. – Подольск: ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2025. – С. 21-22.

8. **Никипелова А.К.**, Бардуков Н.В., Доцев А. В., Никипелов В. И. Анализ генетического полиморфизма сибирского осетра (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) и родственных видов с использованием микросателлитных локусов // Исследования молодых ученых в реализации приоритетов научно-технологического развития в области животноводства: Сборник тезисов докладов молодежной научной конференции, ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 25 марта 2026 года. – Подольск: ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2026. – С. 31-32.

Свидетельство о государственной регистрации базы данных:

9. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024620556 Российская Федерация. Фенотипические показатели сибирского осетра, разводимого в условиях замкнутого водоснабжения: № 2024620192: заявл. 25.01.2024: опубл. 05.02.2024 / Н. А. Зиновьева, **А. К. Никипелова**, В. И. Никипелов (и др.); заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста».

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ:

10. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2024684100 Российская Федерация. «Фенотипические показатели сибирского осетра, разводимого в условиях замкнутого водоснабжения»: № 2024669684: заявл. 22.08.2024: опубл. 14.10.2024 / П. И. Отраднов, Н. В. Бардуков, **А. К. Никипелова** (и др.); заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства - ВИЖ имени Л.К. Эрнста».

Методические рекомендации

11. Методические рекомендации по проведению молекулярно-генетической экспертизы племенного материала сибирского осетра (*Acipenser baerii*), разводимого в товарной аквакультуре / Н. В. Бардуков, **А. К. Никипелова**, В. И. Никипелов (и др.). – Подольск: ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2024. – 32 с.

12. Методические рекомендации по генетической паспортизации сибирского осетра (*Acipenser baerii*) ленской популяции аквакультурного происхождения / Н. В. Бардуков, **А. К. Никипелова**, В. И. Никипелов (и др.). – Дубровицы: ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2025. – 36 с.

Личное участие. Автор лично участвовал в планировании исследования, сборе биологического материала, выполнении всех этапов молекулярно-генетического анализа (выделение ДНК, подбор условий ПЦР, генотипирование), статистической обработке и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций и написания текста диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 160 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы. Работа иллюстрирована 37 таблицами и 36 рисунками. Список литературы, включает 156 источников, в том числе 117 иностранных.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Биологические особенности сибирского осетра (*Acipenser baerii*, Brandt 1869)

Царство: Животные (Animalia)

Тип: Хордовые (Chordata)

Класс: Лучеперые рыбы (Actinopterygii)

Отряд: Осетрообразные (Acipenseriformes)

Семейство: Осетровые (Acipenseridae)

Род: Осетры (Acipenser)

Вид: Сибирский осетр *(Acipenser baerii,* Brandt 1869*)*

Сибирский осетр (*Acipenser baerii,* Brandt 1869) – полупроходная рыба, имеющая речную и озерную формы (озеро Байкал). Обитает в бассейнах рек Сибири. Морфологически сибирский осетр соответствует общим характеристикам семейства Acipenseridae*:* удлиненное веретеновидное тело, разнородная длина рыла, прерванная нижняя губа. Видовым диагностическим признаком служат веерообразные жаберные тычинки (от 20 до 49). Плавниковая формула включает: 30-58 лучей в спинном плавнике и 15 – 33 в анальном. Окраска спины и боков варьирует от светло-серой до темно-коричневой, брюхо серовато-белое. Продолжительность жизни в среднем 60 лет. Репродуктивные характеристики вида варьируют в зависимости от популяции. В природе половозрелость у самцов наступает не ранее 17 – 18 лет, у самок в возрасте 19 – 20 лет, исключение составляет ленская популяции, которая созревает раньше (11 – 12 лет) при меньших размерах. Нерест происходит в период с конца мая по июль при температуре воды 21^0С на участках с каменисто-гравийным или гравийно-песчаным субстратом при скорости течения примерно 1,4 м/с. (Решетников Ю. С., 2002).

Сибирский осетр ленской популяции не совершает протяженных миграций, постоянно живет в пресной воде, неприхотлив, имеет широкий спектр питания, устойчив к паразитарным заболеваниям. В отличие от других популяций сибирского осетра (обского, байкальского, енисейского) осетры популяции р. Лена созревают при минимальных для этого вида размерах и в более раннем возрасте

(самцы при длине 65 – 70 см, массе около 1,5 – 2 кг и в возрасте 9–10 лет; самки соответственно 70 – 75 см, 2 – 2,5 кг, 12 – 13 лет) (Хрусталев Е. И. и др., 2022). Абсолютная плодовитость ленской популяции сибирского осетра составляет 16,5 – 91,7 тыс. икринок. Относительная плодовитость – 7,2 – 32,7 тыс. шт.

Нерест в Оби происходит в конце мая - июне при температуре 12 – 18^{0}С. В нерестовом стаде самки составляют 55 – 60%, самцы 40-45%. Масса обского осетра составляет до 210 кг. Абсолютная плодовитость от 79 тыс. до 1459 тыс. икринок. Периодичность нереста в природе: самцов 1 раз в 3 года, самок 1 раз в 5 лет. В Енисее нерест происходит в июне-июле при температуре воды от 16 до 21^{0}С. Плодовитость варьирует от 83,2 до 607,6 тыс. икринок, периодичность нереста самцов 1 раз в 4 года, самок – раз в 5 лет. Байкальский осетр нерестится с середины мая по середину июня при температуре воды от 9 до 15^{0}С, плодовитость при этом составляет 211 – 832 тыс. икринок. Согласно исследованиям (Рубан Г. И., 1999), нерест в нижнем течении Индигирки происходит в июле – августе и при более низких температурах воды (13 – 16 ^{0}С), чем в Колыме. Для колымской популяции характерны более поздние сроки созревания и более широкий температурный диапазон нереста (конец июня –июль при 16 – 21^{0}С). Отмечается также существенная разница в темпе полового созревания. В Индигирке осетр достигает зрелости при минимальных для вида показателях: самцы в 9–10 лет (масса 1,5-2 кг), самки в 11 – 13 лет (масса около 2 кг). В Колыме созревание наступает позже (около 16 лет при массе 2,2 кг). Абсолютная плодовитость индигирской популяции варьирует от 105,5 до 245,3 тыс. икринок, в то время как у колымского осетра этот показатель колеблется в пределах 65,6 – 227,8 тыс. икринок (Рубан Г. И., 2021).

Сибирский осетр, как и большинство рыб рода Acipenser, обычно питается бентосом. В пределах естественного ареала обитания, которым являются сибирские реки, его пищей служат бентосные организмы, такие как ракообразные (Copepoda, Cladocera и т.д.), личинки хирономид (Chironomidae, Plecoptera, Trichoptera и другие). По мере роста рыб происходят возрастные изменения в размере и составе потребляемых кормовых объектов, что выражается в расширении пищевого

спектра. На большей части своего ареала сибирский осетр продолжает питаться и в зимний период (Kolman R., Kapusta A., 2018).

Достижение нерестовой зрелости у особей сибирского осетра в условиях индустриального рыбоводства зависят от кормления и температуры содержания. Так, самцам требуется 3 – 5 лет, а самкам 4 – 7 лет. Икра сибирского осетра немного темнее и мельче, чем у русского осетра. Диаметр составляет 2,7 – 2,9 мм, а при многократном нересте до 3,4 мм. В условиях установки замкнутого водоснабжения межнерестовый период: у самцов 1 – 1,5 года и 1 – 1,8 года у самок. Оплодотворение икринок составляет в среднем 80 – 85 %. При температуре инкубации 14 – 17 °С вылупление происходит через 6 – 10 дней и может занять несколько дней. Выживаемость находится в диапазоне 70 – 80%. Масса 10 г/шт достигается при температуре 16-20 °С через 70 – 80 дней.

1.2 Ареал обитания и экологические особенности сибирского осетра

Сибирский осетр обладает самым обширным ареалом обитания среди осетровых, населяя крупные реки Сибири (Обь, Енисей, Лена) и озеро Байкал (Ruban G. I., 1997, 2005).

Сибирский осетр обитает в крупных притоках Оби. В Обь – Иртышском бассейне северная граница проходит в Обской губе у мыса Дровяной (Дрягин П. А., 1948). Ареал сибирского осетра простирается по всей длине реки Иртыш, от устья до территории Китая. В крупных притоках Енисея – Ангаре, Подкаменной Тунгуске и нижней Тунгуске. Северной границей распространения в р. Енисей считается бухта Широкая Енисейского залива, а южной до строительства ГЭС считалось село Означенное (в настоящее время Саяногорск). В озере Байкал места обитания сибирского осетра в основном расположены вблизи устьев средних притоков. Больше всего его в дельте реки Селенга, а также в основных заливах Байкала. Байкальский осетр в основном заходит в крупные реки бассейна озера, где расположены места нереста. Вдоль Селенги он мигрирует на расстояние до 1000 км (Егоров А. Г., 1961). В реке Индигирка осетр встречается от устья до 850 км и иногда поднимается выше (Кириллов Ф. Н., 1955; Рубан Г. И., 2021).

В отличие от многих других представителей семейства, *A. baerii* является преимущественно пресноводным, хотя отдельные популяции могут совершать сезонные миграции в эстуарные зоны (Birstein V. J., 1993; Billard R., Lecointre G., 2001). Широкое распространение в разнородных условиях среды способствовало формированию у сибирского осетра высокой экологической пластичности и адаптационного потенциала (Ruban G. I., 1998, 2005), а также устойчивости к заболеваниям (Bauer O. N. et al., 2002). Эти качества определили его ценность для аквакультуры, где вид стал одним из ключевых объектов разведения в России, Китае, Франции и других странах (Bronzi P. et al., 2011; Wei Q. et al., 2011).

Сибирский осетр обладает широкой нормой реакции, которая позволяет данному виду формировать внутри своего ареала жизненные стратегии. На популяционном уровне, выделяются несколько четко выраженных стратегий, сформированных на основе термических и трофических условий. Быстрорастущая тепловодная форма бассейна реки Обь, обитающая в наиболее благоприятных условиях с высокой годовой суммой тепла, характеризуется ранним созреванием, одинаковой продолжительностью жизни самок и самцов и относительно низкими показателями генеративного обмена. Для этой популяции, наряду с оседлыми формами, характерна уникальная нагульная миграция в Обскую губу и обратно, вызванная зимними заморами. В противоположность ей, медленнорастущие холодноводные формы рек Лены и Индигирки, существующие в экстремальных условиях с минимальной суммой тепла и бедной кормовой базой направлены на повышение выживаемости потомства. Это выражается в раннем созревании при малых размерах, резком дисбалансе продолжительности жизни (самцы живут почти вдвое меньше самок) и максимальных для вида значениях гонадосоматического индекса и массы икринок, обеспечивающих высокую жизнеспособность молоди. Промежуточное положение занимает байкальская популяция, сочетающая холодноводность с хищным питанием и поздним созреванием, а также популяции Енисея и Колымы (Рубан Г. И., 2019).

Природные популяции сибирского осетра за последние годы подверглись резкому сокращению. Основными причинами деградации стали браконьерство,

строительство гидротехнических сооружений и разрушение нерестилищ. По данным исследований, около 40 % исторических нерестовых участков в бассейне Оби были утрачены из-за строительства ГЭС (Ruban G. I., 1997), что существенно ограничило воспроизводство вида в естественных условиях.

В работе (Вилковой О. Ю. и др., 2023) представлены современные данные о состоянии популяции сибирского осетра в среднем течении реки Лена. Исследование выявило неравномерное распределение осетра на 400-километровом участке реки. Наибольшая плотность популяции была зафиксирована в районе устья Вилюй (163 экз./км^2), что может указывать на существование локального стада, связанного с этим притоком. В других районах плотности были существенно ниже: вблизи г. Якутск 71 экз/км^2 и 44 экз/км^2 у устья реки Алдан. Размерно-возрастная структура популяции характеризовалась преобладанием молоди. Средняя длина рыб составила 43,4 см, при этом 80 % особей имели массу менее 700 г. Численность на исследованных участках варьирует: 17 тыс. экз. у г. Якутск, 47 тыс. экз. у устья Алдан и 55 тыс. экз. у устья реки Вилюй. Присутствие половозрелых особей вблизи устья Алдана позволяет предположить, наличие нерестилищ в этом притоке. В уловах полностью отсутствовали половозрелые самцы, что может быть связано с завершением нерестового хода или их обособленным распределением. Авторы отмечают, что современное состояние и структура популяции остаются сопоставимыми с усредненными ретроспективными данными.

1.3 Современное состояние и перспективы развития осетроводства

Осетровые, в частности промысловые виды Черного и Каспийского морей в начале XXI века столкнулись с резким сокращением численности, что обусловлено комплексом антропогенных факторов. К настоящему времени все виды осетровых находятся под охраной в пределах их ареалов, а коммерческий вылов разрешен лишь в ограниченных объемах в отдельных странах, включая Россию, США и Канаду, несмотря на их включение в Приложения 1 и 2 СИТЕС. Однако, как свидетельствуют данные Международного союза охраны природы (Bronzi P.,

Rosenthal H., 2014) даже усиленные меры защиты не смогли остановить продолжающееся сокращение их численности.

С конца XX века аквакультура осетровых стала компенсировать снижение объемов дикого промысла. Мировые тенденции в производстве и торговле осетровыми, и их продукцией неоднократно описывались, начиная с 1900-х годов (Bronzi P., Rosenthal H., 2014; Bronzi P. et al., 1999, 2011). В последние годы аквакультура осетровых получила развитие не только в традиционных регионах, таких как Россия и Иран, но и в новых для этой отрасли странах, включая Мадагаскар, что отражает глобализацию данного сектора.

Осетроводство в России играет важную роль в сохранении природных популяций осетровых рыб и удовлетворении спроса на такие ценные продукты, как мясо и черная икра. Исторически Россия была мировым лидером по добыче осетровых, особенно в Каспийском и Азово-Черноморском бассейнах. В 1970-х годах общий вылов достигал 28 тыс. тонн в год, а экспорт черной икры превышал 500 тонн. Однако к 1990-м годам вследствие антропогенного воздействия, деградации основных мест обитания вида, естественные популяции сибирского осетра сократились на 90%, и аквакультура стала основным законным источником этих деликатесов.

Отечественное осетроводство находится в периоде активного развития, становясь важной отраслью аквакультуры, которая решает две основные задачи: сохранение исчезающих видов осетровых рыб и обеспечение рынка ценными продуктами – черной икрой и мясом. Первые эксперименты по искусственному разведению осетровых в России начались еще в XIX веке, но настоящий прорыв произошел в советский период, когда были разработаны технологии гормональной стимуляции нереста, инкубации икры и выращивания молоди. В России промышленное осетроводство стало развиваться лишь в 2000-х годах, когда природные запасы достигли критического уровня. В последние годы количество осетровых хозяйств увеличилось с 78 в 2018 году до 102 в 2020 году, производство рыбы в 2017 году достигло 3871 тонны, а объем производства икры в 2018 году составил 54,4 тонны. При этом, с 2005 года продажа всей икры в России

осуществляется исключительно от выращенных рыб, так как промышленный вылов осетровых запрещен. Сегодня Россия входит в число ведущих стран по производству осетровой продукции в аквакультуре, уступая лишь Китаю и некоторым европейским государствам.

В мировой структуре видового состава культивируемых осетровых доминирует сибирский осетр (*Acipenser baerii*), составляющий 39,5 % от общего производства мяса, за ним следуют гибриды (*Huso dauricus* × *A. schrenckii* и *A. baerii* × *A. schrenckii*) – 35,6 %, а также амурский осетр (*A. schrenckii*) – 10,2 %. В производстве икры ведущую роль играют *A. baerii* (31 %), русский осетр (*A. gueldenstaedtii*, 20,4 %), белый осетр (*A. transmontanus*, 12,1 %) и стерлядь (*Acipenser ruthenus 5,2%*). Разведение осетровых осуществляется с использованием различных технологий, включая проточные системы (36 %), рециркуляционные системы аквакультуры (21 %) и садковые хозяйства (18 %), при этом выбор метода зависит от экологических и экономических условий региона. Сибирский осетр, доминирующий в мировом производстве (39,5 %), широко распространен и в России, что обусловлено высокой адаптивностью к искусственному выращиванию, относительно быстрому росту и высокой продуктивности (Harris L., Shiraishi H., 2018; Bronzi P., et al., 2019).

Увеличение числа осетровых ферм и совершенствование технологий аквакультуры являются важными задачами государства. По данным реестра Росрыболовства на 2018 год, в России зарегистрировано 78 осетровых хозяйств. Основными регионами товарного выращивания осетровых являются: Астраханская, Московская, Ленинградская, Ростовская, Воронежская, Белгородская, Тверская, Ярославская и т.д. (https://fish.gov.ru/). Основными объектами товарного осетроводства России являются русский осетр, сибирский осетр, стерлядь, бестер (гибрид белуги и стерляди) и белуга. В 2016-2017 гг. русский осетр был лидером выращивания (примерно 50% от общего производства), за ним следовали сибирский осетр (примерно 20%), стерлядь (15%), бестер (10%), белуга (5%) (Vasilyeva et al., 2019).

Осетроводство в России имеет хорошие перспективы для дальнейшего развития, однако сталкивается с рядом серьезных проблем. Среди них –дефицит маточного стада, высокая стоимость кормов и оборудования, браконьерство, генетические факторы, связанные с инбридингом и снижением разнообразия из-за длительного разведения в искусственных условиях.

В глобальном масштабе аквакультура осетровых также демонстрирует устойчивый рост, играя ключевую роль в сохранении природных популяций и удовлетворении рыночного спроса. Первая официально зарегистрированная продукция товарного осетроводства составила 150 тонн в 1984 году, после чего начался экспоненциальный рост объемов производства. Пиковое значение было достигнуто в 2015 году – 129 608 тонн, а к 2021 году мировой вылов осетровых в аквакультуре достиг рекордных 143 234 тонн, при этом более 85 % объема пришлось на долю Китая. Количество стран, вовлеченных в осетроводство, постоянно увеличивалось: с 38 в 2015 году до 80 в 2021 году (Elhetawy A. I. G. et al., 2023).

Мировое производство черной икры из аквакультуры также демонстрирует положительную динамику: с 110 – 120 тонн в 2008 году до 592,74 тонн в 2019 году. На сегодняшний день Китай является крупнейшим производителем икры (более трети мирового объема), за ним следуют Дания, Россия, Италия и Франция (Elhetawy A. I. G. et al., 2023).

Особого внимания заслуживают долгосрочные государственные программы искусственного воспроизводства, направленные на поддержание естественных популяций осетровых. Первые такие инициативы в Каспийском бассейне появились в конце 1950-х годов, когда советскими учеными была разработана методика пополнения популяций диких осетровых путем контролируемого воспроизводства (Vasilyeva et al., 2019; Elhetawy A. I. G. et al., 2023). С 1953 года в Каспийское море выпущено более 3 млрд экземпляров молоди осетровых рыб, из которых 2,22 млрд (74 %) произведены российскими рыбоводными заводами. В Нижнем Поволжье функционировало девять осетровых рыбоводных заводов (семь

в Астраханской области и два в Волгоградской), что позволяло ежегодно выпускать до 90 – 92 млн. штук молоди (Elhetawy A. I. G. et al., 2023).

В Черном море аналогичные программы восстановления популяций с 1997 года реализует Турция, выпуская молодь шести видов осетровых *(Huso huso, Acipenser gueldenstaedtii, A. sturio, A. nudiventris, A. stellatus и A. ruthenus)* в реки Кызыл-Ирмак, Ешиль-Ирмак, Сакарья и Чорух (Akbulut B. et al., 2011; Tiril S. U., Memis D., 2018; Elhetawy A. I. G. et al., 2023). Благодаря этим усилиям аквакультура не только обеспечивает рынок продукцией, но и вносит значительный вклад в сохранение биоразнообразия осетровых рыб. В связи с деффицитом диких производителей в настоящее время все чаще используют маточные стада, выращенные из заводской молоди (Васильева Л. М. и др., 2015; Elhetawy A. I. G. et al., 2023).

1.4 Разведение сибирского осетра в аквакультуре

Представители семейства Acipenseridae, обладающие высокой коммерческой ценностью, традиционно находятся в центре внимания научных исследований. Однако сибирский осетр длительное время оставался недостаточно изученным, особенно в восточносибирском регионе, что обусловлено труднодоступностью мест его обитания и низкой плотностью в этих районах. Значительный вклад в изучение популяции сибирского осетра реки Лена был внесен с 1961 года под руководством профессора В.Д. Лебедева (МГУ). В 1973 году Смольянов И.И. (ВНИИПРХ) получил первую партию икры ленского осетра для Конаковского тепловодного хозяйства. Совместными усилиями специалистов ВНИИПРХ (Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства), МГУ (Московский государственный университет), ИЭМЭЖ (Институт эволюционной морфологии и экологии животных имени А.Н. Северцова) и ЦПАУ (Центральное производственно-акклиматизационное управление) была разработана технология искусственного воспроизводства, включая методы сбора икры, транспортировки, инкубации и выращивания молоди до половозрелого состояния.

Знаковым достижением стало создание маточного стада на Конаковском осетровом заводе, где в 1981 году впервые получено потомство в условиях аквакультуры (Малютин В. С., Рубан Г. И., 2009). Это позволило предприятию стать ключевым поставщиком ремонтно-маточного материала как для российских, так и для зарубежных ферм. В этом же году молодь сибирского осетра была экспортирована в Венгрию (Рубан Г. И., 1999), положив начало глобальному распространению данного вида в аквакультуре. В настоящее время данный вид занимает ведущее положение в мировом осетроводстве (Сидорова Л. И. и др., 2024), что подтверждает его высокую адаптационную пластичность и коммерческую значимость.

Как отмечалось некоторыми авторами, ленская популяция сибирского осетра является наиболее перспективной для аквакультуры. Это связано с тем, что данный вид способен питаться при низких температурах и эффективно использовать относительно бедную кормовую базу р. Лены. При переселении в более благоприятные условия у ленского осетра наблюдается ускоренный рост и более раннее половое созревание. Однако длительное использование близкородственного материала привело к проблемам инбридинга, включая снижение качества половых продуктов и темпов роста (Майоров Д. А., Хрисанфов В. Е., 2016).

Искусственное воспроизводство ленского осетра на Чернышевском рыбоводном заводе (Якутия) показало, что период адаптации «диких» производителей к искусственному корму занимает не менее 10 месяцев при выживаемости 85,2 %. Средняя масса самок за период адаптации увеличилась в 1,4 раза. Межнерестовый интервал в условиях установки замкнутого водообеспечения сократился в 2 раза (Корентович М. А., Егоров А. Г., 2023).

Сибирский осетр широко используется в гибридизации благодаря следующим особенностям: высокая адаптивность к различным условиям содержания; наличие разных внутривидовых популяций, хорошо отлаженная биотехника разведения и доступность маточного стада.

Работы по гибридизации с участием сибирского осетра начались в конце XX века (Бурцев И. А. и др., 1985; Филиппова О. П., 1985). Наибольший потенциал для

товарного осетроводства и производства икры имеют гибриды между близкородственными видами, поскольку у них реже проявляются негативные эффекты, характерные для скрещиваний между мало- и многохромосомными видами (Бурцев И. А. и др., 1978). Различные варианты скрещиваний были исследованы в ряде работ, среди которых наиболее успешными признаны: гибрид русского осетра и сибирского осетра ленской популяции, гибрид сибирского осетра с белугой и калугой, гибрид сибирского осетра и стерляди, гибрид сибирского осетра с сахалинским (Shivaramu S., et al., 2019; Астафьева С. С., Лозовский А. Р., 2022; Мельченков Е.А. и др., 2023).

Успешное использование сибирского осетра в аквакультуре стало основой для создания высокопродуктивных пород. В России официально зарегистрированы две породы: «Одомашненная форма сибирского осетра» (включена в реестр в 1993 году) и выведенная на ее основе методом целенаправленной селекции более совершенная порода «Лена-1» (2008 г.). Данная порода характеризуется устойчивыми хозяйственно-ценными признаками – высокой скоростью роста, определенными морфологическими параметрами (размер тела, головы, количество жучек) и высокой продуктивностью, что делает ее перспективной для аквакультуры.

1.5 Филогения и эволюционная история сибирского осетра

Осетрообразные (Acipenseriformes) обладают рядом уникальных биологических характеристик, отличающих их от других позвоночных. К их числу относятся крайне медленные темпы эволюции ядерного генома, высокая и вариабельная плоидность (Birstein V. J. et al., 1997; Ludwig A. et al., 2001; Fontana F. et al., 2007; Vasil’ev V. P. et al., 2009), выраженная способность к межвидовой гибридизации, а также значительная морфологическая пластичность.

В настоящее время отряд Осетрообразных представлен 27 видами двух семейств: Polyodontidae и Acipenseridae. Оба семейства известны по ископаемым останкам, датируемым мезозоем: Polyodontidae известен с раннего мелового периода, а Acipenseridae с позднего мелового периода (Hilton E. J., Grande L., 2006). Семейство Polyodontidae состоит из двух родов, каждый из которых является

монотипическим, а в семействе Acipenseridae четыре рода, включающих остальные 25 видов.

Согласно традиционной классификации осетровых, предложенной Бонапартом в 1831 году, семейство Acipenseridae подразделялось на два подсемейства: Acipenserinae и Scaphirhynchinae. Подсемейство Acipenserinae включает 19 видов, два из которых относятся к роду Huso, а 17 – к роду Acipenser. Подсемейство Scaphirhynchinae включает шесть видов: три вида Scaphirhynchus из Северной Америки и три вида Pseudoscaphirhynchus из Центральной Азии (Nelson J. S., 1994; Mayden R. L., Kuhajda B. R., 1996). Однако молекулярно-генетические исследования, основанные на анализе митохондриальной ДНК, существенно изменили представления о филогенетических связях внутри группы. В частности, было доказано, что виды Pseudoscaphirhynchus, обитающие в бассейнах Амурдарьи и Сырдарьи, не являются близкими родственниками североамериканских представителей рода Scaphirhynchus, а филогенетически сближаются с севрюгой (*Acipenser stellatus*) (Birstein V. J. et al., 2002; Hilton E. J., 2005). Примечательно, что морфологическое сходство между Scaphirhynchus и Pseudoscaphirhynchus, вероятно, является результатом конвергентной эволюции, связанной с адаптацией к схожим условиям обитания в водах крупных рек. Кроме того, исследования подтвердили обособленное положение видов рода Huso *(H. huso и H. dauricus)* в системе осетровых (Birstein V. J., DeSalle R., 1998; Krieger J. et al., 2008).

Согласно последним филогенетическим исследованиям, Осетровых (Acipenseridae) можно разделить на 4 основные монофилетические группы (Peng Z. et. al., 2007) (рисунок 1):

– клада объединяющая представителей рода Лопатоносы (Scaphirhynchus);

– клада морских осетров, в которую входят североатлантический осетр (*Acipenser oxyrinchus)* и европейский атлантический осетр *(Acipenser sturio);*

– тихоокеанская клада, включающая семь видов: амурский осетр *(Acipenser schrenckii)*, белый осетр *(Acipenser transmontanus)*, китайский осетр *(Acipenser sinensis)*, корейский осетр *(Acipenser dabryanus)*, зеленый осетр *(Acipenser medirostris)*, сахалинский осетр *(Acipenser mikadoi)* и калуга *(Huso dauricus)*;

– атлантическая клада, включающая 10 видов: русский осетр *(Acipenser gueldenstaedtii)*, адриатический осетр *(Acipenser naccarii)*, персидский осетр *(Acipenser persicus)*, сибирский осетр *(Acipenser baerii)*, тупорылый осетр *(Acipenser brevirostrum)*, озерный осетр *(Acipenser fulvescens)*, шип *(Acipenser nudiventris)*, стерлядь *(Acipenser ruthenus)*, севрюга *(Acipenser stellatus)* и белуга *(Huso huso)*.

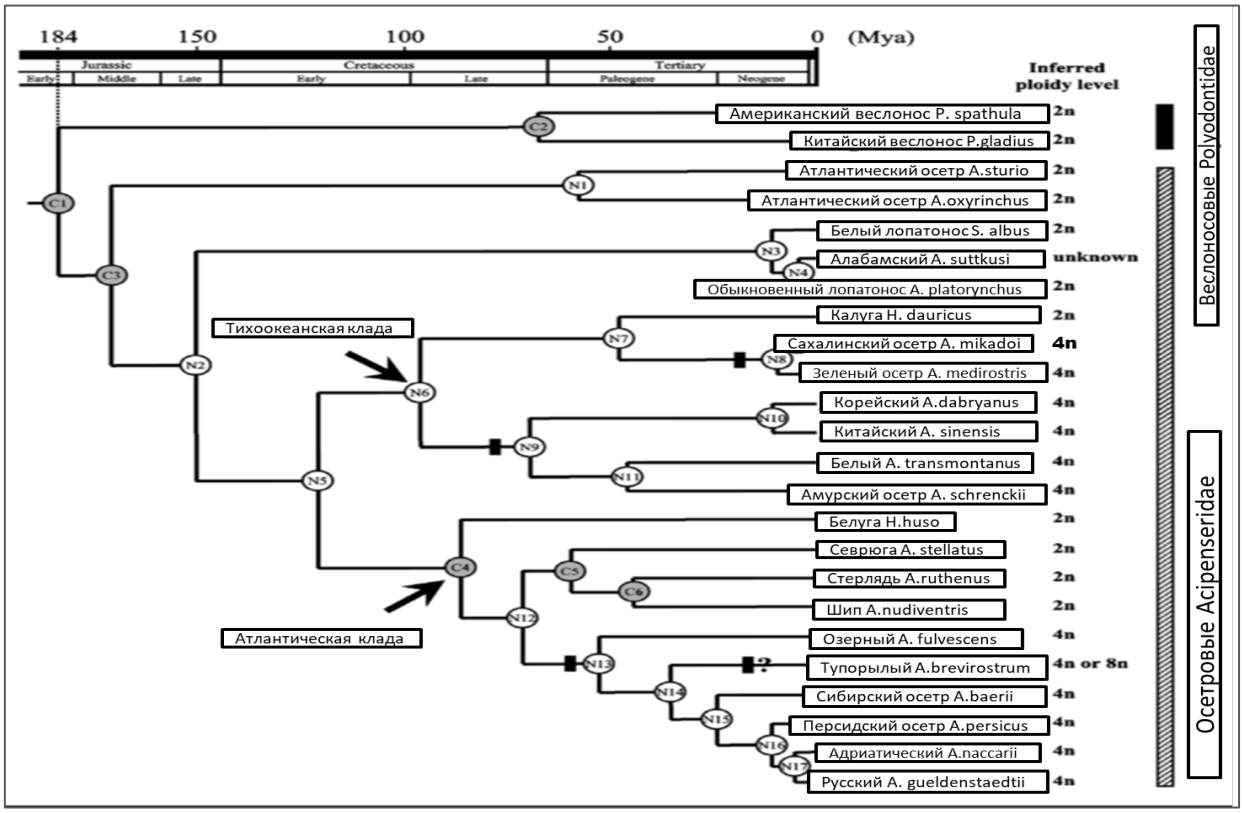


Рисунок 1. Филогенетическое дерево отряда Осетрообразных (Peng Z. et al., 2007)

Особый филогенетический статус занимает сибирский осетр, который несмотря на восточное распространение формирует отдельную группу с русским *(Acipenser gueldenstadtii)*, персидским *(A. persicus)* и адриатическим *(A. naccarii)* осетрами. Согласно молекулярным данным, дивергенция между русским и сибирским осетрами произошла около 24 млн. лет назад, что связано с исторической изоляцией популяций в Арктическом бассейне.

Интересным феноменом является наличие «baerii-подобных» митохондриальных гаплотипов у каспийских популяций русского осетра *(A.*

gueldenstaedtii) (Birstein V. J. et al., 2000; Jenneckens I. et al., 2000), но отличающихся одной нуклеотидной заменой в контрольном регионе (D-петля) митохондриальной ДНК. Этот маркер позволяет достоверно дифференцировать эти гаплотипы с помощью ПЦР-анализа (Mugue N. S. et al., 2008). В научной литературе существует несколько гипотез происхождения данного генетического варианта. Одна из версий связывает его появление с интродукцией в бассейн реки Волги (естественная среда обитания русского осетра) искусственно выращенных особей сибирского осетра *(A. baerii)* (Jennekens I. et al., 2000). Альтернативная гипотеза рассматривает «baerii-подобный» митотип в качестве эволюционно древней формы, общей для нескольких видов осетровых, включая сибирского, русского и персидского (Birstein V. J. et al., 2005).

Особый интерес представляет палеогенетическая концепция, согласно которой формирование данного митотипа могло быть следствием исторической гибридизации между *A. baerii* и *A. gueldenstaedtii* в эпоху плейстоценового оледенения. Этот процесс, сопровождавшийся интрогрессией митохондриальной ДНК, согласуется с известными фактами масштабной перестройки ареалов гидробионтов в ледниковый период (Hewitt G., 2000).

1.6 Структура и особенности генома осетровых рыб

Осетровые представляют собой уникальную модель для изучения эволюции полиплоидии у рыб. Их геном подвергся как минимум трем независимым событиям дупликации, при этом существуют предположения о дополнительных случаях полиплоидизации в ходе эволюции. В научной литературе предложены различные гипотезы, объясняющие происхождение полиплоидности у осетровых: от множественных дупликаций генома (Ludwig A. et al., 2001) в пределах рода до комбинации ауто- и аллоплоидии (Fontana F. et al., 2008), а также гибридизационных процессов, приводящих к аллополиплоидии (Fontana F., 2002). Длительная эволюционная история (около 200 млн лет) и различные уровни плоидности делают эту группу особенно интересной для исследований.

Гипотеза о значении дупликации генома в эволюции позвоночных впервые была предложена (Ohno S., 1970). В отличие от растений, где полиплоидия играет

важную роль в видообразовании, у позвоночных ее влияние долгое время оставалось малоизученным. У осетровых полиплоидия может возникать как за счет автополиплоидии (внутривидовая дупликация хромосом), так и в результате аллополиплоидии (межвидовая гибридизация). По данным (Vasil'ev V. P. et al., 2009) виды отряда Осетрообразных (Acipenseriformes) делятся на три группы по числу хромосом: 120 хромосом (белуга, севрюга, стерлядь), 250 хромосом (русский осетр, сибирский осетр), 370 хромосом (тупорылый осетр).

Исторически первые кариологические исследования, проведенные по метафазным пластинам бластомеров и клеток жаберной слизистой белуги *(H. Huso)* и стерляди *(A. ruthenus),* указывали на диплоидное число 2n = 60 (Серебрякова Е. В., 1972). Другие ученые (Ohno S. et al., 1969) изготовили экваториальные пластинки из фрагментов тканей обыкновенного лопатоноса *(Scaphirhynchus platorhynus)* и сообщили о диплоидном числе 112 хромосом, 48 из которых были микрохромосомами. Высокое количество хромосом позволило авторам предположить тетраплоидный статус данного вида. Аналогичное заключение было сделано (Dingerkus G., Howell W. M., 1976) для веслоноса (*Polyodon spathula).* Исследовав препараты из нескольких тканей, ученые установили, что число хромосом составляет 2n = 120, причем 72 из них являлись микрохромосомами. Авторы расположили хромосомы группами на тетрады, что указывает на тетраплоидность этих видов.

Исследование NOR (Nucleolar Organizer Region) позволило предположить, что виды с примерно 120 хромосомами являются тетраплоидными, а с 250 – октаплоидами (Birstein V. J., Vasil'ev V. P., 1987), однако (Fontana F., 1994), локализовав NOR на восьми хромосомах у нескольких видов *(A. ruthenus, A. baerii, A. transmontanus и A. naccarii)*, интерпретировал это как свидетельство диплоидности для форм с 120 хромосомами и тетраплоидности для форм с 240-250 хромосомами.

Исследования экспрессии генов у осетровых рыб также демонстрируют противоречивые данные относительно их уровня плоидности. Так, (Birstein V. J. et al., 1997) обнаружили дублирующиеся белковые локусы у видов с 120

хромосомами, что интерпретировалось как признак тетраплоидии. Согласно этой логике, виды с 240 хромосомами следовало бы считать октаплоидными. В противоположность этому, анализ сывороточных альбуминов показал, что виды с 120 хромосомами является диплоидными (Кузьмин Е.В., 1996). В тоже время ряд других авторов поддерживает гипотезу о том, что все виды, имеющие 120 хромосом, следует считать тетраплоидными (Ohno S. et al., 1969; Birstein V. J., Vasil'ev V. P., 1987; Birstein V. J. et al., 1997; Flajshans M., Vajcova V., 2000).

Современные исследования подтверждают, что виды с 120 хромосомами имеют тетраплоидное происхождение, тогда как их диплоидный предок предположительно вымер (Birstein V. J., Vasil'ev V. P., 1987; Dingerkus G., Howell W. M., 1976). Аллозимные данные (например, дупликация 31 % локусов у севрюги) также поддерживают эту гипотезу (Ryabova, G. D., Kutergina I. G., 1990). Виды с 250 и 370 хромосомами, соответственно рассматриваются как октоплоидные и додекаплоидные в эволюционной шкале или как тетраплоидные и гексаплоидные в современной классификации (Vasil'ev V. P.et al., 2009).

Недавние исследования (Du K. et al., 2020) выявили, что дупликация генома у стерляди сопровождалась утратой целой хромосомы. Кроме того, обнаружено, что снижение избыточности полиплоидного генома носит случайный характер, а функциональная тетраплоидия у данного вида сохранилась благодаря адаптивным процессам на протяжении 180 млн лет.

Помимо изучения общих закономерностей дупликации, современные исследования уделяют пристальное внимание цитогенетической организации кариотипов осетровых. Так, в работе (Biltueva L. S. et al., 2020) на примере тетраплоидного сибирского осетра было показано, что его кариотип характеризуется значительным увеличением доли акроцентрических хромосом по сравнению с диплоидной стерлядью, что указывает на масштабные перестройки после WGD (Whole Genome Duplication – полногеномная дупликация). С помощью хромосом-специфичных зондов (Arut434A) авторам удалось идентифицировать ортологи 16 хромосом стерляди в геноме сибирского осетра и проследить их эволюцию. Оказалось, что последний раунд дупликации (Ac2R) сопровождался не

простым удвоением, а масштабными хромосомными перестройками (делеции, дупликации).

Польские ученые (Havelka M. et al., 2016) разделяют уровни плоидности на две категории: эволюционная шкала (отражает древние события полиплоидизации): тетраплоиды (4n), октоплоиды (8n), додекаплоиды (12n) (Birstein V. J., Bemis W. E., 1997); функциональная шкала (учитывает редиплоидизацию генома: диплоиды (2n), тетраплоиды (4n), гексаплоиды (6n) (Havelka M. et al., 2013; Fontana F. et al., 2008).

Функциональная диплоидизация – это процесс, при котором полиплоидный геном постепенно возвращается к диплоидному состоянию, сохраняя при этом увеличенное число хромосом. Этот процесс обеспечивает правильное спаривание гомологичных хромосом во время мейоза и митоза. В генетических терминах это означает переход от тетрасомного наследования (четыре аллеля на один локус) к дисомному (два аллеля на локус).

Гибридизация осетровых с разным уровнем плоидности наблюдается как в природных популяциях (Tranah G. et al., 2004; Dudu A. et al., 2011), так и в условиях аквакультуры (Zhang X. et al., 2013). В естественной среде это явление рассматривается как угроза для исчезающих видов, тогда как в аквакультуре оно целенаправленно используется для повышения продуктивности. Потомство от таких скрещиваний может обладать аномальной плоидностью, что регистрировалось как в диких водоемах (Ludwig A., 2009), так и на рыбоводных хозяйствах (Schreier A. D. et al, 2012; Havelka M. et al., 2014). Основными причинами аномалий считаются: автополиплоидия, полиспермия (Vasil'ev V. P., 2009), межвидовая гибридизация (Dudu A. et al., 2011; Ludwig A. et al., 2009). Традиционно предполагалось, что гибриды отдаленно родственных видов с разным числом хромосом стерильны из-за нарушений конъюгации хромосом в мейозе. Однако недавние исследования (Vasil'ev V. P. et al., 2014), проведенные на стерляди *(A. ruthenus)*, калуги *(H. dauricus)* и их гибридов, выявили ограниченную фертильность у самцов гибридов F1 (стерлядь х калуга), что ставит под сомнение устоявшиеся представления о стерильности осетровых с аномальной плоидностью.

Сибирский осетр способен демонстрировать крайне высокие уровни плоидности: так, в исследовании (Havelka M. et al., 2016) описан уникальный случай гептаплоидии (7n) с кариотипом 437 хромосом – второе по величине количество хромосом среди позвоночных после *Ptychobarbus dipogon* (кариотип около 446 хромосом). В качестве основного механизма формирования высокой плоидности и увеличенного числа хромосом авторы подтвердили спонтанное удвоение материнских хромосомных наборов вследствие удержания второго полярного тельца в ходе мейоза 2. Исследованные особи были получены в результате искусственного скрещивания между самцом *A. baerii* с гексаплоидным кариотипом, имеющим спонтанное полиплоидное происхождение и тетраплоидной самкой (4n) того же вида. Данное явление подтверждается микросателлитным анализом, выявившим увеличение доли материнских аллелей в 1,8 раза у гептаплоидных форм по сравнению с пентаплоидными.

Эксперименты по скрещиванию диплоидных (2n) и тетраплоидных (4n) видов, например, стерляди *(Acipenser ruthenus)* и сибирского осетра *(Acipenser baerii),* приводят к образованию триплоидных (3n) гибридов. Особый научный интерес представляют гибриды, полученные от производителей с аномальной плоидностью. Так, исследование (Shivaramu S. et al., 2020) показало, что скрещивание пентаплоидных (5n) и гексаплоидных (6n) особей *A. baerii* с диплоидной *A. ruthenus* приводит к формированию гибридов с плоидностью ~3.5n и 4n соответственно. Аналогично, в потомстве от тетраплоидных *A. baerii* и пентаплоидных/гексаплоидных особей того же вида наблюдаются гибриды с уровнями плоидности ~ 4.5n и 5n.

Жизнеспособность таких гибридов варьирует в зависимости от генетической совместимости родительских геномов. В то время как некоторые комбинации (например, *A. baerii* × пентаплоидный *A. baerii*) демонстрируют высокие темпы роста, другие (*A. ruthenus* × пентаплоидный/гексаплоидный *A. baerii)* оказываются нежизнеспособными. У успешно развивающихся гибридов нередко наблюдается гетерозис по хозяйственно-ценным признакам, включая скорость роста и массу тела, что делает их перспективными для аквакультуры. Однако их потенциальное

попадание в природные экосистемы требует строгого контроля ввиду риска нарушения генетической структуры природных популяций.

1.7 Микросателлитные ДНК-маркеры: характеристика, свойства и применение в генетике

Микросателлиты представляют собой тандемные повторы, состоящие из 1-6 нуклеотидов, широко распространенные в ядерных геномах большинства организмов. Эти последовательности также известны как простые SSR (simple sequence repeats) и короткие тандемные повторы (STR – short tandem repeats). Активное изучение микросателлитов способствует понимаю их мутационных механизмов, функциональной роли, эволюционных закономерностей и распределения как внутри генома, так и среди таксонов (Li Y. C. et al., 2002; Ellegren H., 2004).

Основными преимуществами микросателлитов являются информативность, повторяемость и простота анализа. Длина микросателлитных локусов обычно колеблется от 5 до 40 повторов, хотя встречаются более протяженные варианты. Наибольшее применение в молекулярно-генетических исследованиях находят ди-, три-, и тетрануклеотидные повторы. При этом динуклеотидные микросателлиты преобладают в геномах многих видов (Li Y. C. et al., 2002). Тринуклеотидные и гексануклеотидные повторы чаще локализуются в кодирующих областях, поскольку их полиморфизм не вызывает сдвига рамки считывания, что минимизирует негативное влияние на функциональность генов (Toth G. et al., 2000). В отличие от них, мононуклеотидные повторы считаются менее надежными маркерами из-за трудностей амплификации, а более длинные повторы мало изучены ввиду их редкости и недостатка данных об их эволюционной динамике.

Микросателлиты активно используются для изучения структуры популяций, идентификации, анализа родословных и геномного картирования (Kim K.-R. et al., 2024). Например, у атлантической трески (*Gadus morhua*) микросателлитные маркеры выявили генетические различия между северо-западными и юго-восточными популяциями (Pogson G. H. et al., 2001). Аналогичные исследования

проведены на патагонском клыкаче (*Dissostichus eleginoides*) (Ward R. D. et al., 2002) и цихлидах озера Танганьика (Taylor M. I. et al., 2001).

Микросателлиты широко применяются в популяционной генетике благодаря их кодоминантной природе, что позволяет различать гетеро- и гомозиготные состояния диплоидных организмов (Sunnucks P., 2000). Это свойство делает их ценным инструментом для оценки генетического разнообразия, популяционной структуры и дифференциации, а также для изучения инбридинга (Lyu D. et al, 2023; Huvier N. et al., 2023). С развитием технологий секвенирования нового поколения (NGS) идентификация микросателлитов стала более доступной, что способствует их сохранению в качестве популярных маркеров, несмотря на появление новых методов (Guichoux E. et al., 2011).

Однако у полиплоидных организмов использование микросателлитов сопряжено с рядом ограничений. Основная проблема заключается в сложности точного определения аллельных комбинаций из-за множественных копий генома. Например, у тетраплоида наличие трех аллелей в локусе может соответствовать несколькими генотипами (AABC, ABBC, ABCC), а присутствие нулевых аллелей или артефактов ПЦР (например, «заикающихся» полос) дополнительно усложняет интерпретацию (Esselink G. D. et al., 2004).

Для решения этой проблемы был предложен метод MAC-PR (microsatellite DNA allele counting-peak ratios), основанный на измерении соотношения интенсивности пиков на хроматограмме. Сила сигнала (высота пика) аллеля пропорциональна его доле в геноме. Это позволяет не только идентифицировать присутствующие аллели, но и оценить их количественное соотношение, то есть определить в одной, двух или трех копиях представлен каждый аллель (Landergott U. et al., 2006; Luttikhuizen P. C. et al., 2007).

Еще одной проблемой являются нулевые аллели, которые искажают оценку гетерозиготности и частот аллелей (Dakin E. E., Avise J. C., 2004). У полиплоидов, особенно аллополиплоидов, риск их появления возрастает из-за геномных перестроек и различий в гомологах (Parisod C. et al., 2009; Vergilino R. et al., 2009). Это затрудняет достоверное генотипирование и повышает вероятность артефактов.

Несмотря на эти сложности, микросателлиты успешно применяются в исследованиях полиплоидных видов. Например, они помогли выявить инвазивные линии тростника обыкновенного *(Phragmites australis)* (Saltonstall K., 2003) и проанализировать клональное разнообразие лавровишни португальской *(Prunus lusitanica)* (Garcia-Verdugo C. et al., 2013) и клинтонии удской *(Clintonia udensis)* (Han M. et al., 2024). При правильном определении дозы аллелей, микросателлиты позволили сравнить генетическое разнообразие диплоидов и полиплоидов, подтвердив, например, более высокое разнообразие у автотетраплоидной жерухи земноводной *(Rorippa amphibia)* по сравнению с диплоидами (Luttikhuizen P. C. et al., 2007). Однако при высоких уровнях плоидности преимущества микросателлитов могут нивелироваться из-за неопределенности генотипирования.

Перспективным направлением является использование NGS (Next Generation Sequencing) для изучения полиморфизма микросателлитных локусов, что может минимизировать ошибки, связанные с гомоплазией, и повысить точность анализа (Guichoux E. et al., 2011). Однако, чтобы в полной мере использовать эти маркеры для полиплоидов, необходимы дальнейшие методологические разработки, включая алгоритмы, учитывающие неопределенность дозировки, и стандартизированные протоколы валидации.

1.8 Применение микросателлитных маркеров у представителей осетровых

Многие представители осетровых (Acipenseridae) являются полиплоидными организмами, обладающими более чем двумя парами гомологичных хромосом (Ludwig A. et al., 2001; Pyatskowit J. D. et al., 2001; Schreier A. D. et al., 2011). Проведение микросателлитного анализа у таких видов сопряжено с рядом трудностей, включая наличие нулевых аллелей и сложности в точном определении числа копий генов. Кроме того, большинство доступных биоинформатических программ ориентировано на классическое диплоидное (дисомное) наследование, что ограничивает их применение при изучении полиплоидных геномов.

Медленная эволюция ядерной ДНК осетровых на молекулярном уровне позволяет исследовать многие виды с помощью одних и тех же микросателлитных

локусов (Zane L. et al., 2002). Большинство праймеров, предназначенных для амплификации определенных локусов у одного вида осетровых, применимы и к другим видам, несмотря на вариабельность полиморфизма. В частности, 20 пар праймеров, созданных для русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, эффективно амплифицировали соответствующие локусы у десяти различных видов осетровых (Rajkov J. et al., 2014).

Первые исследования генетического разнообразия осетровых с использованием микросателлитных маркеров были сосредоточены на североамериканских видах (McQuown E. C. et al., 2000; King T. L. et al., 2001; Pyatskowit J. D. et al., 2001; Henderson-Arzapalo A., King T. L., 2002; Welsh A. B. et al., 2003; Welsh A. B., May B., 2006; Fopp-Bayat D., 2010). В отличие от них, европейские виды изучены в меньшей степени. Например, для адриатического осетра (*Acipenser naccarii*) были разработаны видоспецифичные микросателлиты с целью контроля процесса реинтродукции в реку По (Италия), однако анализ локусов осложнялся тетраплоидной природой этого вида (Zane L. et al., 2002; Forlani A. et al., 2008). На понто-каспийских видах микросателлитный анализ применялся реже: исследованы популяции севрюги (*A. stellatus*) в Каспийском море (Norouzi M., Pourkazemi M., 2009), а также популяции русского осетра *(A. gueldenstaedtii)* в северо-западной части Черного моря, Северном Каспии и Азовском море (Тимошкина Н. Н. и др., 2009).

В исследовании (Fopp-Bayat D., 2010) шесть микросателлитных локусов *(Afu19, Afu39, Afu68, AfuB68, Spl163, Spl168)* использовались для оценки генетического разнообразия маточного стада сибирского осетра (*Acipenser baerii*), выращиваемого на рыбной ферме в Польше. Анализ выявил 74 аллеля с высоким уровнем полиморфизма, подтвердив эффективность микросателлитов для мониторинга генетической структуры и контроля инбридинга в аквакультуре.

В другом исследовании (Fopp-Bayat D., Woznicki P., 2006) был применен комплексный подход, сочетающий цитогенетический анализ с исследованием микросателлитного локуса *Afu-68* для верификации плоидности у потомства сибирского осетра и его гибридов с русским осетром. Авторы продемонстрировали,

что гаплоидные особи (полученные путем гиногенеза с использованием УФ-инактивированной спермы) содержали около 120 хромосом и проявляли аллели только материнского генома. В то же время «диплоидные» и «триплоидные» формы демонстрировали соответственно 240 и 360 хромосом, а также аллельные профили, свидетельствующие о наследовании генетического материала от обоих родителей.

В исследовании (Moghim M. et al., 2025) применили 8 микросателлитных локусов для анализа генетического разнообразия белуги (*Huso huso*) на рыбоводных фермах Ирана. Локус *Ls19* продемонстрировал максимальное аллельное разнообразие (16 аллелей), тогда как *Afu54* оказался наименее полиморфным (3 аллеля), что подчеркивает вариабельность информативности разных маркеров. В другой работе (Харзинова В. Р. и др., 2024) на основе 12 микросателлитных STR-локусов изучили генетическую структуру трех заводских и пяти природных популяций стерляди *(Acipenser ruthenus)*. Нижневолжская группа показала наименьшее аллельное разнообразие и гетерозиготность («эффект основателя»). Енисейская популяция оказалась наиболее обособленной с избытком гетерозигот. Выборки волго-каспийского происхождения и донская популяция характеризовалась низкой дифференциацией и сходством аллелофонда. Авторы подчеркивают необходимость генетического мониторинга для сохранения генофонда стерляди.

Микросателлитные маркеры представляют собой эффективный инструмент для исследования плоидности и процессов диплоидизации, поскольку позволяют проводить прямую оценку количества аллелей на локус. В исследовании, проведенном зарубежными учеными (Rajkov J. et al., 2014) был выполнен анализ 20 полиморфных локусов у 10 видов осетровых рыб. Результаты показали, что у видов, традиционно считающихся диплоидными (*Huso huso, A. ruthenus, A. stellatus*), более 80 % локусов демонстрируют дисомный тип наследования. Напротив, у тетраплоидных видов *(A. gueldenstaedtii*, *A. baerii, A. naccarii* и др.) доля дисомных локусов не превышала 23 %. Эти данные свидетельствуют о незавершенности процесса диплоидизации у тетраплоидных представителей осетровых.

Особенности наследования микросателлитов у полиплоидных осетровых представляют значительный интерес. В работе (McQuown E. C. et al., 2000) протестировали микросателлитные локусы на представителях рода Scaphirhynchus (лопатонос *S. platorynchus* и бледный осетр *S. albus*) и Acipenser (белый осетр *A. transmontanus*, озерный осетр *A. fulvescens* и зеленый осетр *A. medirostris*). Авторы установили, что у Scaphirhynchus преобладало дисомное наследование, тогда как у Acipenser чаще наблюдались признаки тетраплоидии или более высокого уровня плоидности.

В исследовании (Georgescu S. E. et al., 2013), ученые изучили полиморфизм микросателлитных локусов у русского осетра, используя маркеры, разработанные для американских видов (*A. fulvescens, A. oxyrinchus*). Значительная часть локусов демонстрировала тетрасомный тип наследования.

Интересно, что в работе (Havelka M. et al., 2013) обнаружили несколько тетрасомных локусов у диплоидных видов, что свидетельствует о различной степени диплоидизации генома у современных осетровых.

Дальнейшее развитие представления о типах наследования микросателлитных локусов у полиплоидных осетровых получили в диссертационном исследовании (Барминцева А. Е., 2018). Автор систематизировала возможные сценарии распределения аллелей в гаметы у тетраплоидных видов, которые определяют наблюдаемые генотипы потомков в экспериментальных скрещиваниях. В общем случае, если у родительской особи в локусе присутствуют четыре различных аллеля (например, A, B, C, D), то возможны следующие варианты наследования.

Тетрасомный (тетрадный) тип наследования. При сохранении полной гомологии между всеми четырьмя гомологичными хромосомами в мейозе формируется тетрада и в гамету с равной вероятностью может попасть любая комбинация из двух аллелей, случайно выбранных из родительского набора. Все возможные пары аллелей равновероятны: AB, AC, AD, BC, BD, CD в соотношении 1:1:1:1. Такой тип наследования характерен для локусов, сохранивших исходную тетраплоидную структуру.

Диплоидизированный тетрасомный тип наследования. У большинства видов, прошедших геномную дупликацию, со временем происходит частичная диплоидизация: ранее идентичные хромосомы накапливают различия, и в мейозе образуются не четверки, а две независимые пары гомологов. В этом случае в гамету не могут попасть два аллеля, расположенные на одной конъюгирующей паре. При родительском генотипе ABCD возможны три варианта исходного распределения аллелей по хромосомным парам (табл. 1).

Таблица 1 – Варианты распределения аллелей при диплоидизированном тетрасомном типе наследования

Вариант	Пара 1	Пара 2	Комбинации гамет	Не образуются
А	A/B	C/D	AC, AD, BC, BD	AB, CD
Б	A/C	B/D	AB, AD, BC, CD	AC, BD
В	A/D	B/C	AB, AC, BD, CD	AD, BC

Полностью диплоидизированный (дисомный) тип наследования. Дальнейшая дивергенция между тетраплоидными сестринскими хромосомами может привести к утрате одной пары гомологов, делеции микросателлитного локуса на одной из пар; мутациям в праймерных сайтах, препятствующих амплификации. В данном случае наблюдается всего два аллеля на локус, а наследование полностью соответствует классическому диплоидному типу.

Рассмотренные типы наследования микросателлитных локусов имеют не только теоретическое, но важное прикладное значение. Понимание того, по какому сценарию наследуется конкретный маркер у конкретного вида, является необходимым условием для корректной интерпретации генетических данных, в частности – при решении задач видовой идентификации и выявлении гибридных особей. Микросателлитные маркеры играют ключевую роль в определении чистоты видов и обнаружении гибридизации, что особенно актуально для осетровых, среди которых широко распространены как естественные, так и искусственно полученные межвидовые гибриды.

В работе (Барминцева А.Е., Мюге Н.С., 2013) проведена видовая идентификация десяти видов осетровых с использованием пяти микросателлитных

локусов (*Afug41, Afug51, An20, AoxD161, AoxD165*). Локус *An20* продемонстрировал видоспецифичные аллели для семи видов, что делает его перспективным маркером для генетической дифференциации. Данная система внедрена в практику генетического мониторинга на осетровых рыбоводных заводах и используется для контроля искусственного воспроизводства в рамках программы Росрыболовства.

Для точного определения гибридного статуса в ряде случаев требуется проведение комплексного анализа с применением молекулярных методов и статистических подходов. Так, в исследовании (Dudu A. et al., 2011) разработали эффективный метод генетической идентификации гибридов четырех видов дунайских осетровых (*Huso huso, Acipenser stellatus, A. gueldenstaedtii* и *A. ruthenus*), основанный на анализе полиморфизма восьми микросателлитных маркеров (*LS19, LS34, LS39, LS54, Aox27, AoxD234, AnacE4, AnacC11*). В работе использовали несколько статистических программ: факторный анализ соответствий (FCA) в пакете Genetix, байесовский кластерный анализ Structure version 2.1 (Pritchard J. K. et al., 2000) и определение гибридных категорий с помощью NewHybrids (Anderson E. C., Thompson E. A, 2002). FCA и Structure достоверно разделили выборку на четыре кластера, соответствующие чистым видам и выделили пятую группу гибридных особей. Проведенный анализ выявил ряд случаев несоответствия между морфологической и молекулярной идентификацией. В частности, две особи, первоначально отнесенные к чистым видам на основании морфологических признаков, по данным микросателлитного анализа были определены как гибриды: между русским осетром *(A. gueldenstaedtii)* и белугой *(H. huso),* а также между русским осетром *(A. gueldenstaedtii)* и севрюгой *(A. stellatus).* Анализ в программе NewHybrids позволил точно определить гибридные категории: среди гибридов севрюги и белуги – 37,5 % были отнесены к первому поколению (F1), а 62,5 % – к возвратным гибридам с севрюгой.

В работе (Yang S. et al., 2025) применили метод, сочетающий анализ митохондриального гена *COI* и шести микросателлитных маркеров (*Ab3, Ab5, As1, LS19, HLJSX7, HLJSX30*) для определения гибридных форм между такими видами как: сибирский осетр *Acipenser baerii* × амурский осетр *A. schrenckii*.

Микросателлитные маркеры показали высокую эффективность, четко разделив 100 особей (8 видов и 2 гибрида) на 10 генетических кластеров. Аналогичное исследование провели ученые из Румынии (Dudu A. et al., 2022), которые применили многоэтапную методологию идентификации на основе ядерных и митохондриальных маркеров. Объектами анализа выступили пять видов осетровых (белуга, севрюга, стерлядь, русский и сибирский осетр), а также гибриды – стербел и особи неизвестного происхождения.

Современные исследования направлены на создание комплексных методов для мониторинга популяций и контроля в аквакультуре. Научный коллектив (Panagiotopoulou H. et al., 2014) разработал мультиплексную систему из 16 микросателлитных маркеров для генетического мониторинга атлантического осетра (*Acipenser oxyrinchus*). Пять диагностических локусов (*AoxD161, AoxD188, AoxD297, AoxD242, AoxC30*) эффективно дифференцировали два вида осетровых – атлантического *A. oxyrinchus* от европейского осетра (*A. sturio*).

В исследовании (Wang J. et al., 2022) разработали 10 микросателлитных локусов (OM320532, OM320533, OM320534, OM320535, OM320536, OM320537, OM320538, OM320539, OM320540, OM320541), выделенных из транскриптома китайского осетра (*Acipenser sinensis*). Данные локусы показали высокую эффективность в установлении родительского происхождения стерляди (*A. ruthenus*). Так, совокупная вероятность исключения (CE) составляла 99.99% для случая, когда генотипы обоих родителей известны (CE-PP), 99.96% – когда известен генотип одного родителя (CE-1P), и 99.49% – когда информация о родителях отсутствует (CE-2P).

1.9 Изучение генетического разнообразия популяций сибирского осетра

Изучение филогеографии, популяционной структуры и генетического разнообразия сибирского осетра *(Acipenser baerii)* как в природных условиях, так и в аквакультуре в значительной степени базируется на анализе митохондриальной ДНК (мтДНК).

Важный вклад в понимание генетического разнообразия природных популяций внесли ученые (Барминцева А. Е., Мюге Н. С., 2017). В их работе был

проведен филогеографический анализ последовательностей контрольного региона мтДНК особей сибирского осетра из пяти ключевых популяций: бассейнов рек Обь-Иртыш, Енисей, Лена, Колыма и озера Байкал. В результате было выявлено 50 уникальных митохондриальных гаплотипов, при этом лишь семь из них являлись общими для нескольких популяций, что указывает на значительную генетическую дифференциацию. Наибольшее гаплотипическое разнообразие наблюдалось в обской и байкальской популяциях. Напротив, популяция реки Колыма продемонстрировала выраженную генетическую обедненность. Особый интерес представляет байкальская популяция, показавшая максимальное нуклеотидное разнообразие и содержащая полный спектр предковых гаплотипов, что позволило авторам выдвинуть гипотезу об ее роли как рефугиума в период плейстоценовых оледенений.

Говоря об анализе аквакультурных стад сибирского осетра, картина радикально меняется. Исследование мтДНК на особях сибирского осетра из 13 рыбоводных хозяйств, проведенное исследователями (Барминцева А. Е., Мюге Н. С., 2018) выявило резкое снижение гаплотипического разнообразия по сравнению с природными популяциями. Так, в стадах ленского осетра доминируют два гаплотипа: BaeH3 и BaeH7 (93% выборки), тогда как в природной популяции реки Лена их доля не превышает 52%. Аналогичная картина наблюдается и у обских осетров, разводимых в аквакультуре. Полученные данные свидетельствует об эффекте основателя и последующей инбредной депрессии при одомашнивании, что ведет к существенной потере адаптивного потенциала культивируемых стад.

Помимо мтДНК, значительное внимание уделяется изучению ядерного генома. В работе ученых (Мюге Н. С., Барминцева А. Е., 2020) на основе экспериментальных скрещиваний был проанализирован характер наследования аллелей полиморфных микросателлитных локусов. Установлено, что сибирский осетр является функциональным тетраплоидом, который демонстрирует тетрасомный тип наследования для большинства тестируемых локусов (например, *Afug41, An20, AoxD165*), что подтверждает гипотезу о полногеномной дупликации в семействе Acipenseridae. Для некоторых локусов было выявлено октасомное

наследование. На основе этих данных была разработана и валидирована мультиплексная ПЦР-система из пяти STR-локусов (*Afug41, Afug51, AoxD161, AoxD165, An20)*, которая применяется для генетического мониторинга искусственного воспроизводства, паспортизации маточных стад и идентификации происхождения молоди.

Дальнейшим развитием геномных исследований стала разработка ядерных SNP-маркеров для видовой идентификации и детекции гибридов. В ходе анализа данных ddRAD-секвенирования был идентифицирован высокоспецифичный SNP-маркер для сибирского осетра. На его основе созданы аллель-специфичные праймеры, позволяющие достоверно дифференцировать *A. baerii* от других видов, включая русского осетра (Мюге Н. С., Барминцева А. Е., 2020).

Проведенный анализ литературы позволяет сделать ряд основных выводов о сибирском осетре *(Acipenser baerii)* как о биологическом виде, так и об объекте аквакультуры. Сибирский осетр, обладающий обширным ареалом обитания, демонстрирует высокую экологическую пластичность, которая проявляется в образовании популяций с различными жизненными стратегиями в зависимости от условий обитания (обская, ленская, байкальская и др.). Однако, несмотря на эту адаптивность, дикие популяции вида находятся на грани вымирания из-за браконьерства, гидростроительства и деградации нерестилищ, что обусловило его включение в Красную книгу. Критическое состояние природных запасов сподвигло к развитию аквакультуры осетровых. Сибирский осетр имеет ряд преимуществ (высокая адаптивность к искусственным условиям, устойчивость к заболеваниям), благодаря которым данный вид является одним из ключевых объектов мирового осетроводства. Успехи в разработке биотехники его разведения, создании маточных стад и выведении пород («Лена-1») подтверждают высокий потенциал сибирского осетра для товарного выращивания.

С генетической точки зрения сибирский осетр представляет собой уникальную модель для изучения полиплоидии. Данный вид является функциональным тетраплоидом, а его сложный геном, сформированный в результате полногеномной дупликации, демонстрирует разнообразные уровни

плоидности и механизмы наследования. Это создает как возможности (получение высокопродуктивных гибридов), так и риски (инбридинг, снижение генетического разнообразия) в аквакультуре. Для решения этих задач незаменимым инструментом выступают молекулярно-генетические методы. Анализ мтДНК выявил значительное генетическое разнообразие природных популяций, в то время как в аквакультурных стадах сибирского осетра наблюдается резкое обеднение генофонда. Микросателлитные маркеры успешно применяются для видовой идентификации, определения гибридов, контроля происхождения и мониторинга генетического разнообразия осетровых рыб в условиях искусственного воспроизводства. Таким образом, сибирский осетр представляет собой объект, требующий комплексного подхода, основанного на применении современных методов рыбоводства и передовых молекулярно-генетических технологий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования были проведены в период с 2022 по 2026 гг. на базе ФГБНУ ФИЦ ВИЖ имени Л.К. Эрнста по схеме, представленной на рисунке 2.



Рисунок 2. Схема диссертационного исследования

2.1 Материалы исследований

Материалом для исследования послужили образцы тканей сибирского осетра ленской популяции из разных рыбоводных хозяйств. Дополнительно были отобраны образцы ткани русского, сахалинского, амурского осетров, калуги, шипа, севрюги и стерляди на рыбоводных предприятиях (МПЭРЗ и ООО РТФ «Диана») в период плановых бонитировок.

Основные данные по выборке сибирского осетра представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика исследуемой выборки осетровых видов рыб

Вид/Группа	Обозначение	Кол-во особей	Плоидность	Происхождение
Сибирский осетр (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) Ленское происхождение	AB_Di	55	4n	Аквакультура. Экспериментальная популяция №1 УЗВ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, ленское происхождение – ООО РТФ "Диана", Вологодская область, Кадуйский район, рабочий поселок Кадуй
Сибирский осетр Ленское происхождение	AB_MP	44	4n	Аквакультура. Экспериментальная популяция №2 УЗВ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, ленское происхождение – ФГБУ Главрыбвод МПЭРЗ, Московская область, Можайский муниципальный округ.
Сибирский осетр Ленское происхождение	AB_Ud	21	4n	Аквакультура. Ленское происхождение. Осетровое рыбоводное хозяйство в г. Удомле, Тверская область.
Сибирский осетр Ленское происхождение	AB_Aq	18	4n	Аквакультура. Ленское происхождение. Сельскохозяйственный потребительский перерабатывающий кооператив "Аквaферма", Ленинградская область.
Сибирский осетр Ленское происхождение	AB_Ma	39	4n	Аквакультура. ЗАО Мансуровское рыбоводное хозяйство Московская область, Истринский район, д. Алексеевка.
Сибирский осетр. Енисейское происхождение	AB_EN	33	4n	Аквакультура. Рыбоводное хозяйство в селе Рыбное. Красноярский край.
Сибирский осетр Обское происхождение	AB_OB	13	4n	Аквакультура. ООО «Пышма-96», г. Тюмень.
Русский осетр (*Acipenser gueldenstadtii* Brandt&Ratzeburg, 1833)	AGUE	39	4n	Аквакультура. ФГБУ Главрыбвод МПЭРЗ, Московская область, Можайский муниципальный округ.
Сахалинский осетр (*Acipenser mikadoi* Hilgendorf, 1892)	AMIK	10	4n	Аквакультура. ООО РТФ "Диана", Вологодская область, Кадуйский район, рабочий поселок Кадуй.
Амурский осетр (*Acipenser schrenckii* Brandt, 1869)	ASCH	24	4n	Аквакультура. ФГБУ Главрыбвод МПЭРЗ, Московская область, Можайский муниципальный округ.
Калуга *(Huso dauricus* Georgi, 1775)	HDAU	6	4n	Аквакультура. ФГБУ Главрыбвод МПЭРЗ, Московская область, Можайский муниципальный округ.

Вид/Группа	Обозначение	Кол-во особей	Плоидность	Происхождение
Белуга (*Huso huso*, Linnaeus 1758)	HUS	22	2n	Аквакультура. Осетровое хозяйство в Истринском районе, Московская область.
Шип (*Acipenser nudiventris* Lovetsky, 1828)	ANUD	6	2n	Аквакультура. ФГБУ Главрыбвод МПЭРЗ, Московская область, Можайский муниципальный округ.
Севрюга *(Acipenser stellatus* Pallas, 1771)	ASTE	68	2n	Аквакультура. ООО РТФ «Диана» Аквакультура. ФГБУ Главрыбвод Лебяжий ОРЗ, Астраханская область.
Стерлядь (*Acipenser ruthenus* Linnaeus,1758)	ARUT	48	2n	Аквакультура. ФГБУ Главрыбвод МПЭРЗ, Московская область, Можайский муниципальный округ.

Для установления характера наследования и определения родства родительских групп сибирского осетра и их потомков была проведена серия экспериментальных скрещиваний – для каждой группы потомков были известны родительские особи, от которых были получены половые продукты.

Оплодотворенную икру инкубировали в аппаратах Вейса, личинку отбирали сразу после выклева и фиксировали в спирте. Данная работа была выполнена на базе рыбоводного предприятия ООО РТФ «Диана» Вологодская область, Кадуйский район, рабочий поселок Кадуй в период нерестовой кампании. Характеристики экспериментальных групп представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика экспериментальных групп сибирского осетра

№ группы	Производители (№ по базе данных ФГБНУ ФИЦ ВИЖ)	Количество тестируемых потомков	Год получения
1	♀2774, ♂2773, ♂2776, ♂2781	24	2024
2	♀2774, ♂2772, ♂2782, ♂2779	24	2024
3	♀2777, ♂2773, ♂2775, ♂2781	24	2024
4	♀2783, ♂2773, ♂2775, ♂2779	24	2024
5	♀2780, ♂2775, ♂2779, ♂2781, ♂2782	24	2024
6	♀2778, ♂2772, ♂2776, ♂2781	24	2024
Общее количество	12	144	2024

2.2 Методы исследований

2.2.1 Подготовка проб

Пробы биоматериала отбирали у рыб прижизненно, производя срез плавника. Для предотвращения деградации ДНК фиксировали пробы ткани рыб в 96%-ом этиловом спирте. Если объем пробы достаточно велик (объемная доля этилового спирта в пробирке с образцом менее 70%), то на вторые сутки необходимо слить спирт и заменить его на новый. Срез ткани производится медицинскими ножницами, которые необходимо дезинфицировать перед каждым использованием. Для этого также лучше всего использовать этиловый спирт, так как он не будет оказывать ингибирующего воздействия на ПЦР в отличие от хлорсодержащих дезинфицирующих средств. Участок плавника размером 5х10 мм вполне достаточен для выполнения анализа. Каждому образцу присваивали индивидуальный номер и вносили в электронную базу данных, также указываются известные данные о происхождении рыбы (данные о родителях, принадлежность к породе, гибридное происхождение и т.д.), возраст, морфометрические параметры особи, дата и место отбора проб.

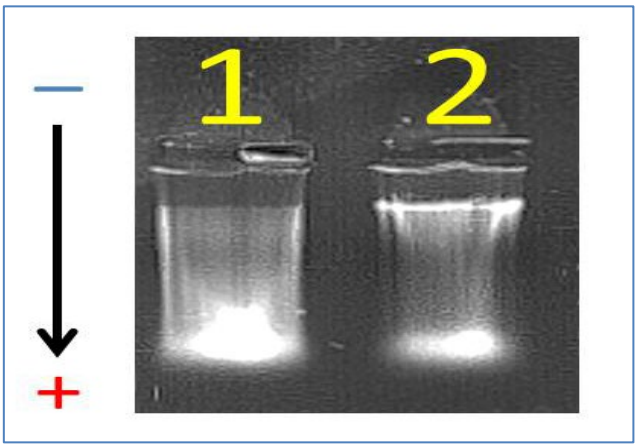
Хранение заспиртованных образцов осуществляли при температуре -20^{0}С, транспортировка и кратковременное хранение допускается при комнатной температуре. При неправильном хранении происходит деградация ДНК. В дальнейшем такие пробы станут непригодными для выполнения ПЦР.

2.2.2 Выделение и подготовка ДНК

Материалом для выделения ДНК служили срезы плавников. В данном исследовании использовали коммерческий набор реагентов для выделения геномной ДНК из тканей животных «ДНК-Экстран-2» (НПК «Синтол», Россия). Лучше избегать методов и коммерческих наборов, которые предполагают получение ПЦР-совместимого лизата, так как он может содержать большое количество ингибиторов ПЦР, что особенно нежелательно при мультиплексировании ПЦР.

Качественную оценку выделенной ДНК проводили с помощью электрофореза в агарозном геле (1 – 1,5 % агарозы). После 30 минут электрофореза

($I \approx 100$ mA, $U \approx 120$ V) ДНК должна образовать четкую полосу, соответствующую высокомолекулярной фракции, при этом короткие деградированные участки ДНК не должны составлять основную фракцию ДНК (рис. 3).



Примечание: 1 – ДНК низкого качества, 2 – ДНК нормального качества.

Рисунок 3. Качественная оценка выделенной ДНК

Оценку выделенной ДНК выполняли с использованием флуориметра Qubit (Thermo FS, США). Для постановки ПЦР отбирали пробы с концентрацией не менее 10 нг/мкл. Хранение выделенной ДНК осуществляли при температуре – 20^0C. В ходе работы избегали частых циклов размораживания и замораживания проб ДНК – каждый такой цикл ведет к деградации ДНК.

2.2.3 Подбор микросателлитных маркеров

На первом этапе работы на основе данных научной литературы был сформирован набор микросателлитных маркеров, потенциально пригодных для генотипирования сибирского осетра. Учитывая филогенетическую близость видов семейства Acipenseridae, отбор проводился среди локусов, изначально разработанных для других представителей осетровых. В общей сложности в исследование было включено 48 микросателлитных локусов, происхождение и условия применения которых подробно описаны ниже. Источники и условия применения маркеров распределились следующим образом.

Девять микросателлитных локусов *(Ag01, Ag10, Ag12, Ag14, Ag18, Ag22, Ag28, Ag49, As043)*, первоначально охарактеризованных для рода *Acipenser*, были отобраны согласно данным (Rajkov J. et al., 2014).

Группа из одиннадцати локусов *(Agu 38, Agu 37, Agu 41, Agu 15, Agu 51, Agu 59, Agu 34, Agu 36, Agu 46, Agu 56, Agu 54)* подробно описаны и апробированы в исследовании (Kohlmann K. et al., 2018). Локус *Aox9* применяли согласно протоколу, описанному (Georgescu S. E. et al., 2013) при исследовании гибридов русского и сибирского осетров. Для анализа пяти локусов *(Ls 19, AoxD234, AnacC11, Aox27, Ls 39)* были использованы условия ПЦР, рекомендованные в работе (Dudu A. et al., 2011) в рамках исследования гибридизации дунайских осетровых.

Микросателлитные локусы *Afu54* и *Afu68b* в работе (Moghim M., et al. 2025) были использованы для генетического анализа белуги. Четыре локуса *(Aox 45, AoxC45, AoxD161, Ls68)* протестированы ранее в работе (Panagiotopoulou H., et al., 2014) для атлантического осетра. Локусы *An20, AfuG41, AfuG51* были выбраны на основе работы (Барминцевой А. Е., Мюге Н. С., 2013), посвященной видовой идентификации и выявлению гибридов у осетровых рыб.

Тестирование локуса *Spl 163* подробно описано в исследовании (McQuown E. C. et al., 2000), а микросателлитный локус *AfuG63* в работе (Hassanzadeh S. M., Hallajian A, 2014). Группа локусов *(Afu19, Afu34, Afu39, Afu54, Spl101)* в работе (Havelka M. et al., 2014).

Три микросателлитных локуса *AcR7V, AcR12V, AcR13V* были разработаны самостоятельно на основе анализа геномных последовательностей стерляди с последующей проверкой амплификации на ДНК сибирского осетра. Локус *Aru18* использовали согласно мультиплексной панели (Kohlmann K., et al. 2017). Другие локусы: *AfuG112, Aru13* входят в состав маркеров мультиплексной панели, предназначенной для стерляди (Никипелов В.И. и др., 2024).

Однако, не все они одинаково эффективны (как в плане уровня полиморфизма, так и возможности определения дозы аллелей) при выполнении генетического анализа сибирского осетра.

2.2.4 Критерии выбора микросателлитных локусов

Отбор STR-маркеров для работы с сибирским осетром проводился по строгим критериям (Барминцева А. Е., 2018; Бардуков Н. В. и др., 2025):

1. Уровень плоидности – локус не должен иметь более четырех аллелей у одной особи, что соответствует тетраплоидной природе сибирского осетра. Наличие большего числа аллелей может указывать на дупликацию или артефакты амплификации, что делает его непригодным для достоверного анализа.

2. Отсутствие нулевых аллелей. Все аллельные варианты в генотипе должны стабильно и эффективно амплифицироваться. Нулевые аллели, возникающие из-за мутаций в сайтах связывания праймеров, приводят к ошибкам в определении генотипа и искажению данных о генетическом разнообразии.

3.Стабильность и воспроизводимость амплификации. Результаты ПЦР должны быть четкими и воспроизводимыми в повторных экспериментах.

4. Высокий уровень полиморфизма.

5. Возможность определения дозы аллелей – надежная визуализация оценки количественного соотношения аллелей.

Локусы, не соответствующие этим критериям, отбраковывались, даже если демонстрировали высокий уровень полиморфизма.

2.2.5 Подбор температуры отжига

Первоначально для каждого миросателлитного локуса в режиме синглплекса методом градиентной ПЦР в диапазоне 12 температурных режимов определяли оптимальную температуру отжига праймеров с помощью градиентного ДНК-амплификатора *Labcycler* (SensoQuest, Германия). Важным условием для создания мультиплекса было сходство температур отжига входящих в него праймерных пар; максимальный разброс не превышал 2-3^0 С. Результаты визуализировали методом электрофореза в 3 % агарозном геле (рис. 4).

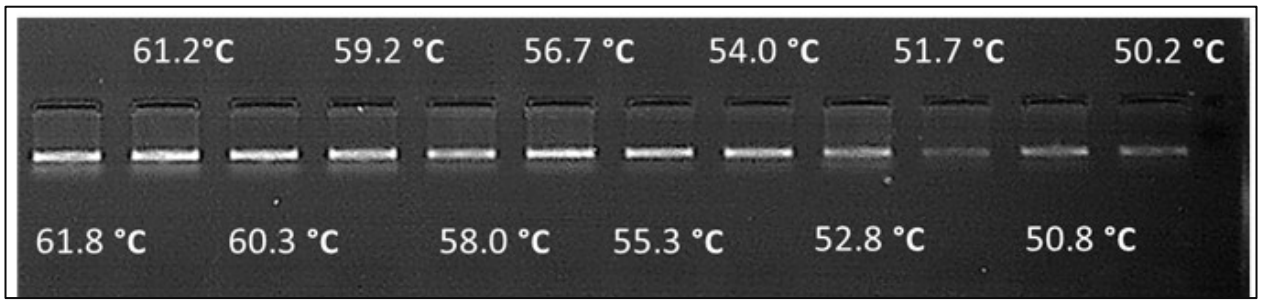


Рисунок 4. Подбор температур отжига на примере локуса *Agu38*

2.2.6 Состав реакционной смеси

Тестирование особей сибирского осетра с помощью микросателлитных маркеров показывает достаточно высокую частоту аллелей, связанных с однонуклеотидными вставками/делециями (нехарактерным для микросателлитов полиморфизмом). Для достоверной идентификации подобных аллельных вариантов проводили тщательную оптимизацию компонентов ПЦР-смеси. В противном случае наличие артефактных пиков на электрофореграммах может существенно затруднить интерпретацию полученных данных и привести к ошибочным выводам (рис. 5).



Рисунок 5. Артефактные пики, появление которых вызвано неоптимальным составом компонентов реакционной смеси ПЦР (локус *Ls 19*)

Основными факторами, влияющими на эффективность амплификации, являются состав ПЦР-буфера, концентрация ионов магния ($MgCl_2$), а также качество ДНК-полимеразы. При работе с коммерческими реактивами протестировали несколько вариантов ПЦР-буфера и готовых смесей для выявления оптимальных условий. В данном исследовании наилучшие результаты были достигнуты при использовании Turbo-буфера (Евроген, Россия) в сочетании с *Smart Taq*-полимеразой («Диалат Лтд.», Россия).

ПЦР выполнялась в конечном объеме 15 мкл. Реакционная смесь в расчете на 1 образец имела следующий состав: 10-ти кратный Turbo-buffer (ЗАО «Евроген», Россия) в количестве 1,5 мкл; смесь нуклеотидов (dNTP)1,5 мкл, 0,1 мкл *Smart Taq* полимераза («Диалат Лтд.», Россия). При постановке синглплексных ПЦР добавляли 0,05 мкл раствора праймеров (концентрация праймеров в растворе = 10 пкМ/мкл) и 1 мкл ДНК 10-кратного разведения. Рабочие варианты реакционных смесей для каждой из трех панелей приведены в таблицах 4, 5, 6.

Таблица 4 – Состав реакционной смеси для мультиплексной ПЦР (Панель №1)

Реактив	Объем на пробу, мкл
Вода	10,09
10× ПЦР-турбо буфер	1,5
Смесь ∑dNTPs (2mM)	1,5
Смесь праймеров локуса *An20* (10 пкМ/мкл)	0,1
Смесь праймеров локуса *Aru18* (10 пкМ/мкл)	0,12
Смесь праймеров локуса *Agu38* (10 пкМ/мкл)	0,2
Смесь праймеров локуса *As043* (10 пкМ/мкл)	0,24
Taq-ДНК-полимераза (5ед/мкл)	0,1
MgCl2 (100 mM)	0,15
ДНК	1

Таблица 5 – Состав реакционной смеси для мультиплексной ПЦР (Панель №2)

Реактив	Объем на пробу, мкл
Вода	10,29
10× ПЦР-турбо буфер	1,5
Смесь ∑dNTPs (2mM)	1,5
Смесь праймеров локуса *Ag49a* (10 пкМ/мкл)	0,08
Смесь праймеров локуса *Agu37* (10 пкМ/мкл)	0,04
Смесь праймеров локуса *Ls19* (10 пкМ/мкл)	0,14
Смесь праймеров локуса *Agu41* (10 пкМ/мкл)	0,2
Taq-ДНК-полимераза (5ед/мкл)	0,1
MgCl2 (100 mM)	0,15
ДНК	1

Таблица 6 – Состав реакционной смеси для мультиплексной ПЦР (Панель №3)

Реактив	Объем на пробу, мкл
Вода	9,71
10× ПЦР-турбо буфер	1,5
Смесь ∑dNTPs (2mM)	1,5
Смесь праймеров локуса *Ag18* (10 пкМ/мкл)	0,4
Смесь праймеров локуса *Ag10* (10 пкМ/мкл)	0,1
Смесь праймеров локуса *Afu39* (10 пкМ/мкл)	0,3
Смесь праймеров локуса *AcR13V* (10 пкМ/мкл)	0,24
Taq-ДНК-полимераза (5ед/мкл)	0,1
MgCl2 (100 mM)	0,15
ДНК	1

Мультиплексную ПЦР осуществляли на амплификаторе SimpliAmp, (Thermo FS, США) по следующему протоколу: первичная денатурация – 10 минут, t = 94 °C; далее – 38 циклов, включающих денатурацию (t = 95 °C, 30 секунд), отжиг праймеров (t = 58 °C, 40 секунд), элонгацию цепей ДНК (t = 72 °C, 35 секунд); далее – этап финальной элонгации (t = 72 °C, 5 минут).

В каждый запуск мультиплексной ПЦР включали обязательные контроли: положительный контроль (образец ДНК сибирского осетра с заранее известным генотипом) и отрицательный контроль (стерильная вода вместо матрицы ДНК) для исключения контаминации и проверки специфичности амплификации.

2.2.7 Фрагментный анализ

Степень разведения ПЦР-продуктов оптимизирована под прибор Нанофор 05 (НПК «Синтол», Россия). ПЦР-продукты, полученные от мультиплексных реакций, а также смеси, полученные из синглплексных реакций, разбавляли деионизированной водой в 10 раз. В новый ПЦР-планшет, совместимый с генетическим анализатором, добавляли смесь, содержащую высокоочищенный формамид (9 мкл на каждую лунку планшета), стандарт длин SD-450 (НПК «Синтол», Россия) (0,5 мкл на каждую лунку). В каждую лунку со смесью формамида и стандарта длин добавляли 1,5 мкл разбавленного деионизированной водой ПЦР-продукта. Планшет запечатывали септой, и проводили процедуру денатурации ДНК (t = 95 °C, 5 минут). Далее выполняли фрагментный анализ в

генетическом анализаторе Нанофор 05 согласно инструкции фирмы-производителя (НПК «Синтол», Россия).

2.2.8 Статистическая обработка

Первичная обработка данных выполнена в программном обеспечении GeneMarker (Version 3.0.1 https://soft-genetics.com/products/genemarker/). Для анализа результатов фрагментного анализа тетраплоидных микросателлитных локусов были использованы следующие программные средства, доступные для пользователей в свободном доступе.

Анализ главных координат (Principal Coordinate Analysis, PCoA) выполнен с использованием языка программирования R (Version 4.6.0; https://cran.r-project.org/) в среде Rstudio с применением библиотек *plotly* и *polychrome* (Clark L. V., Jasieniuk M., 2011).

Выделение генетических кластеров в общей выборке, присвоение коэффициентов подобия каждому образцу, визуализация генетической структуры популяций и выявление гибридных особей проведены в программе STRUCTURE (Version 2.3.4 https://web.stanford.edu/) (Pritchard J. K. et al., 2000; Hubisz M. J. et al., 2009). Визуализацию результатов кластерного анализа производили с помощью *R*-пакета *pophelper* (Francis R. M., 2017).

В зависимости от цели анализа (разделение по хозяйствам или по видам) диапазон возможного числа генетических кластеров (*K*) варьировали от 1 до 15. Для каждого значения *K* выполнялось по десять независимых запусков (повторов). Параметры модели заданы следующим образом: «burn-in period» составлял от 10000 до 100000 итераций.

Расчет стандартных популяционно-генетических показателей: среднее количество аллелей на локус (N_A), количество эффективных аллелей (N_{AE}), аллельное разнообразие (A_R), наблюдаемую гетерозиготность (H_O), ожидаемую гетерозиготность (H_E), коэффициент инбридинга (F_{IS}), индекс фиксации (F_{ST}) проводился в программе SPAGeDi (Version 1.5d; https://ebe.ulb.ac.be/ebe/SPAGeDi.html) (Hardy O., Vekemans X., 2002). Значения

параметров генетического разнообразия представлены в виде средних (M) и стандартных ошибок средних (±SEM).

Идентификация родительских пар выполнялась на основе алгоритма, разработанного на языке Python (Version 3.12 https://docs.python.org/3/reference/).

Файл таблицы Microsoft Excel, содержащий генетические профили особей сибирского осетра, конвертировался в формат данных в соответствии с руководством выбранного программного обеспечения.

Генетическая сеть построена по типу «ближайшего соседа» (Neighbor - Net) на основе матрицы попарных значений показателя F_{ST} с использованием программы SplitsTree 4 (Version 4.19.2) https://software-ab.cs.uni-tuebingen.de/download/splitstree6/welcome.html (Huson D. H., Bryant D., 2006).

2.2.9 Определение дозы аллелей в микросателлитных локусах

Методика количественного определения дозы аллелей основана на анализе относительной интенсивности флуоресцентного сигнала (высоты пиков) на электрофореграмме, получаемой в ходе фрагментного анализа. Для тетраплоидных организмов, таких как сибирский осетр, соотношение высот пиков соответствует доле (копийности) каждого аллеля в генотипе. Данный подход, подробно изложенный в диссертационной работе (Барминцевой А. Е., 2018), был адаптирован и апробирован в нашем исследовании. Интерпретация результатов проводилась с использованием программного обеспечения GeneMarker, позволяющего оценивать не только размер, но и интенсивность пиков. Основные типы генотипов по количеству аллелей представлены на рисунках 6 – 9.

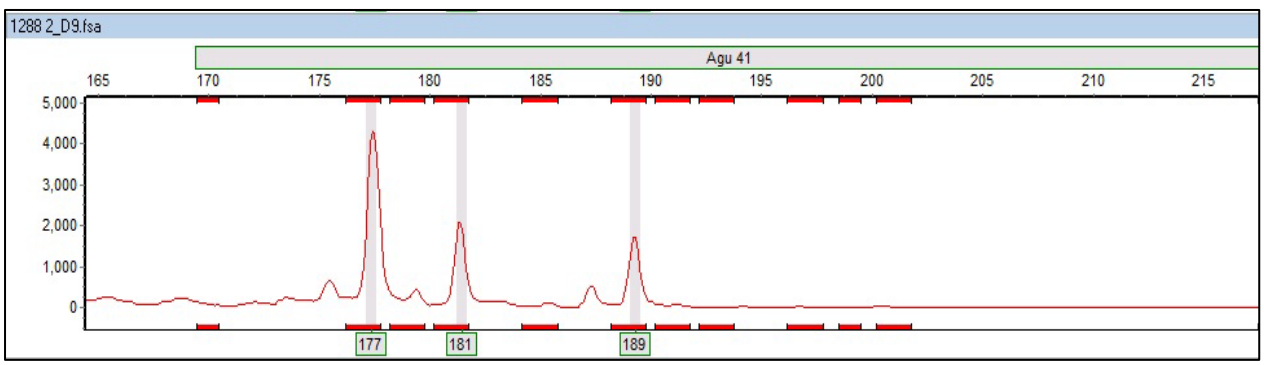


Рисунок 6. Электрофореграмма аллелей по микросателлитному локусу *Agu41*, генотип в данном случае записывается так: 177, 177, 181, 189

На рисунке 6 высокий пик, соответствующий аллелю 177 п.н., указывает на его присутствие в двух дозах (копиях). Пики аллелей 181 и 189 п.н. имеют сопоставимую интенсивность, характерную для одной дозы каждого из этих аллелей.

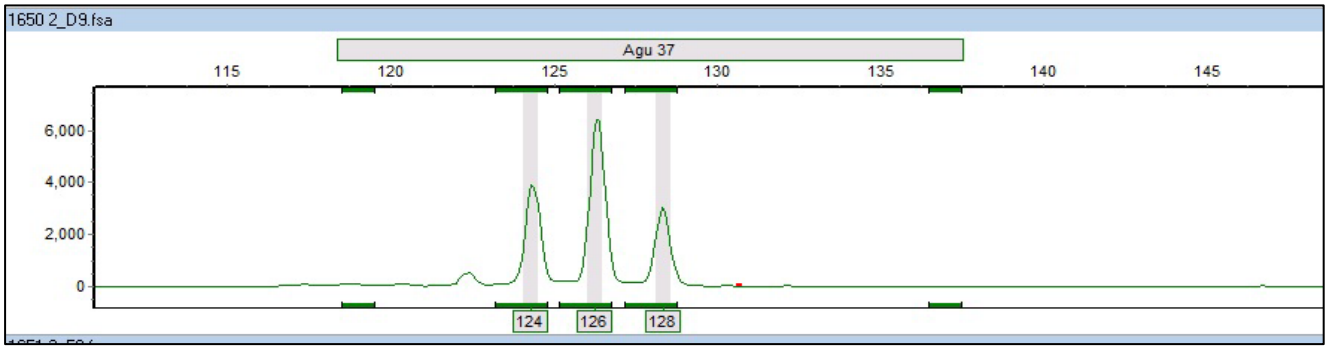


Рисунок 7. Электрофореграмма аллелей по микросателлитному локусу *Agu37*, генотип имеет следующий вид: 124, 126, 126, 128

На рисунке 7 представлен генетический профиль сибирского осетра по микросателлитному локусу *Agu37*. Аллель 126 п.н. проявляется в виде пика с наибольшей интенсивностью флуоресценции, что свидетельствует о его присутствии в двух дозах. Аллели 124 и 128 п.н. представлены пиками меньшей интенсивности, что характерно для одной дозы каждого из них.

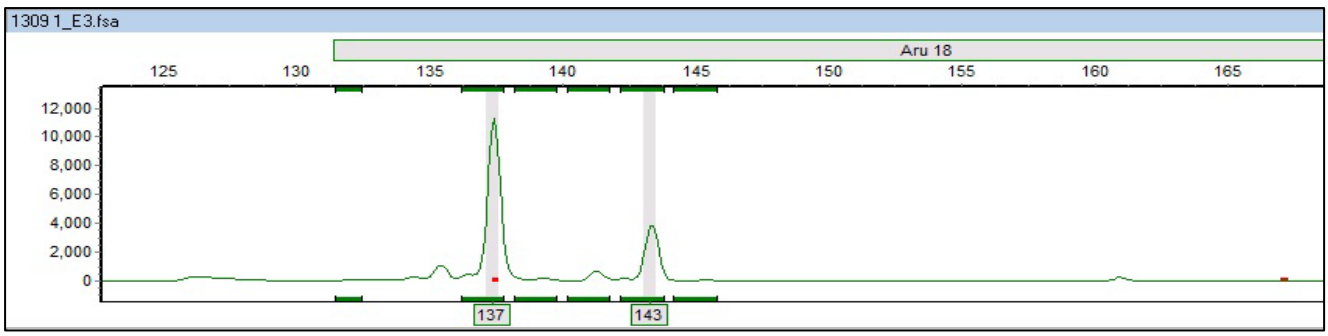


Рисунок 8. Электрофореграмма аллелей по микросателлитному локусу *Aru18*, генотип имеет следующий вид: 137, 137, 137, 143

На рисунке 8 приведен пример профиля по локусу *Aru18*, где аллель 137 п.н. демонстрирует пик с высокой интенсивностью, а аллель 143 п.н. – пик значительно меньшей интенсивности. Такое соотношение позволяет сделать вывод о наличии

трех доз аллеля 137 п.н. и одной дозы аллеля 143 п.н. Генотип записывается как 137, 137, 137, 143.

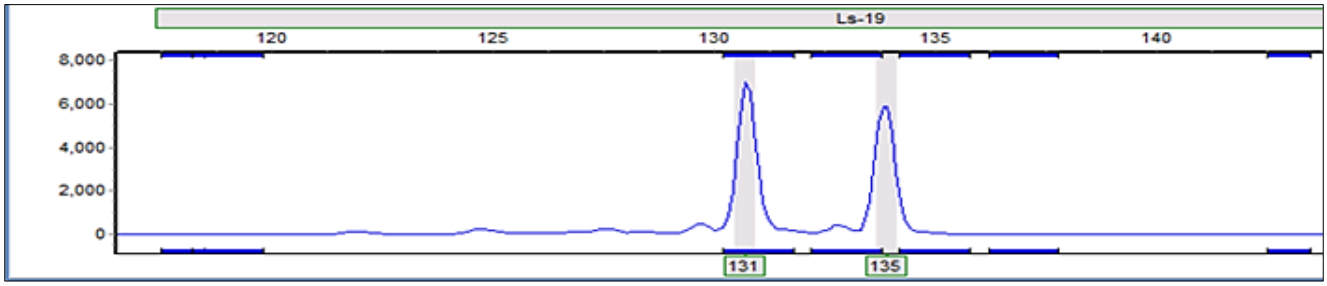


Рисунок 9. Электрофореграмма аллелей по микросателлитному локусу *Ls19*, генотип имеет следующий вид: 131, 131, 135, 135

На рисунке 9 приведен пример профиля по локусу *Ls19*. Пики аллелей обладают сопоставимой высотой, генотип данной особи состоит из двух аллелей длиной 131 п.н. и двух – 135 п.н. При этом правый пик, соответствующий более длинному аллелю незначительно ниже – это нормальное явление, отражающее сравнительно более высокую эффективность синтеза короткого аллеля в ходе ПЦР.

2.2.10 Стандартизация длин микросателлитных локусов

Воспроизводимость результатов между различными лабораториями остается основной проблемой микросателлитного анализа из-за вариабельности электрофоретической подвижности флуоресцентных меток, связанной с различиями в химической структуре красителей, различий в условиях электрофореза и использования разных стандартов длин. Во многих случаях даже использование одного и того же красителя, но разных партий синтеза способно вызвать «сдвиг» аллеля. Для осетровых рыб, ввиду отсутствия международных стандартов генетического анализа (ISAG не располагает валидированными панелями STR-маркеров), данная проблема особенно актуальна.

Дизайн праймеров для синтеза референсных фрагментов ДНК. Для создания набора фрагментов ДНК заданной длины. использовали консервативный участок митохондриального генома сибирского осетра длиной 328 нуклеотидов, расположенный с 1969-го по 2296-й нуклеотид (картирование по референсному

митохондриальному геному сибирского осетра NC_017603.1). К данному локусу была подобрана серия праймеров по схеме, представленной на рисунке 10.

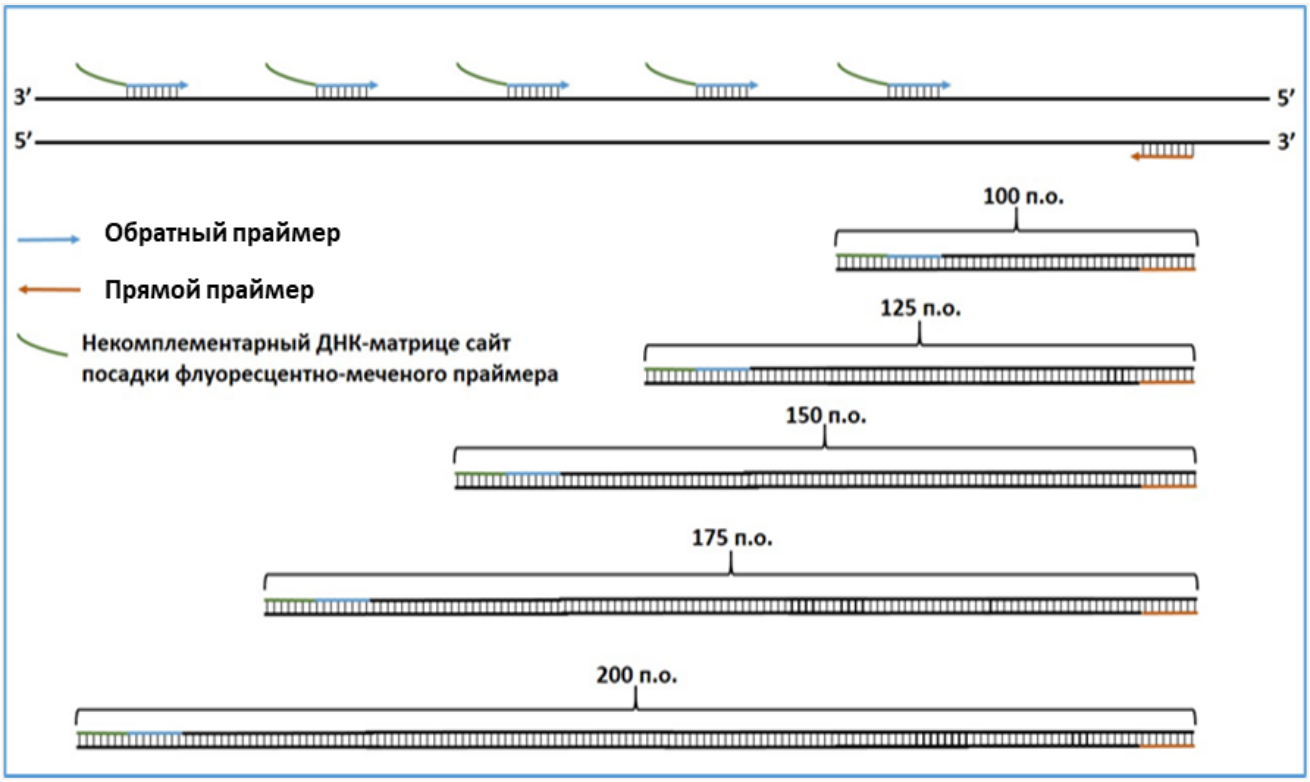


Рисунок 10. Схема подбора праймеров для амплификации серии фрагментов заданной длины

Каждый обратный праймер имел со стороны 5’- конца дополнительный сайт (TCACACAGGAAACAGCTATGAC), используемый в дальнейшем для отжига флуоресцентно-меченого праймера. Пары праймеров, необходимые для получения ампликонов заданной длины указаны в таблице 7.

Таблица 7 – Праймеры для амплификации фрагментов ДНК заданной длины

Название	Последовательность праймера
R-Ac-R-80-350+M13-acip*	TCACACAGGAAACAGCTATGACGGCTTGATRGCATAGTTGATCTTG
F1-Ac-R-350**	TCAAGGAAAGACTAAAAGAAAAAGAAGG
F2-Ac-R-325**	AGGAACTCGGCAAACACGAGC
F3-Ac-R-300**	CCTATTTACCAAAAACATCGCCTC
F4-Ac-R-275**	TGCAAACCAATGTATTAGAGGTCC
F5-Ac-R-250**	GCCTGCCCTGTGACCAAAAGT
F6-Ac-R-225**	CGGCCGCGGTATTTTGACC
F7-Ac-R-200**	AGGTAGCGTAATCACTTGTCTTTTAA
F8-Ac-R-175**	AATGAAGACCTGTATGAATGGCATAA
F9-Ac-R-150**	ACGAGGGCTCAACTGTCTCCT

Название	Последовательность праймера
F10-Ac-R-125**	CCAGTAAGTGAAATTGACCTGCT
F11-Ac-R-100**	TGCAGAGGCGAGCATAAHCC
F12-Ac-R-80**	CAAAAGACGAGAAGACCCTATGG

Примечание: подчеркиванием выделен сайт посадки флуоресцентно-меченого праймера. *Обратный праймер R-Ac-R-80-350+M13-acip (единый для данного набора ПЦР-продуктов), **прямые праймеры.

Дизайн праймеров для микросателлитного локуса с сайтом посадки меченого праймера. Для тестирования системы был использован микросателлитный локус *Ls19*. Стандартный прямой праймер был модифицирован путем добавления на 5'-конец последовательности для гибридизации меченого праймера M-13-FAM (табл. 8).

Таблица 8 – Праймеры для получения ампликонов микросателлитного локуса, содержащих сайт посадки флуоресцентно-меченого праймера (сайт посадки M-13-FAM подчеркнут)

Название	Последовательность праймера
Ls19 F+22	TCACACAGGAAACAGCTATGACCATCTTAGCCGTCTGGGTAC
Ls19 R	CAGGTCCCTAATACAATGGC

Для контрольного секвенирования использовали стандартные праймеры без модификаций. *Ls19*-F (CATCTTAGCCGTCTGGGTAC) и *Ls19*-R (CAGGTCCCTAATACAATGGC).

Условия проведения ПЦР. Состав реакционной смеси для данного и последующего этапов был одинаковым (за исключением концентрации и состава добавляемых праймеров). Реакцию проводили в конечном объеме 20 мкл. В пробирки вносили по 19 мкл реакционной смеси, состоящей из 2 мкл 10X Turbo-буфера (ЗАО «Евроген», Россия), 2 мкл 2 мМ раствора dNTPs, 1 ед. Smart Taq-полимеразы (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия), добавляли 1 мкл исследуемой геномной ДНК (50-100 нг ДНК, либо, в зависимости от этапа, разбавленный ПЦР-продукт), доводили до конечного объема деионизированной водой, количество и состав праймеров отличалось на разных этапах. В первой ПЦР добавляли по 1 мкл раствора (10 пкМ/мкл) праймеров F1-Ac-R-350 и R-Ac-R-80-350+M13-acip.

Реакции выполняли на амплификаторе Thermal Cycler SimpliAmp («Thermo Fisher Scientific, Inc», США). Все реакции выполняли в синглплексном формате (табл. 9 – 12).

Таблица 9 – Температурно-временные параметры для выполнения первой ПЦР (синтез наибольшего фрагмента)

Температура, °С	Продолжительность, сек	Количество циклов
95	600	1
95	45	35
62	40	
72	30	
72	1200	1

Таблица 10 – Температурно-временные параметры ПЦР для синтеза набора фрагментов ДНК заданной длины

Температура, °С	Продолжительность, сек	Количество циклов
95	600	1
95	45	14
62	40	
72	30	
72	1200	1

Таблица 11 – Температурно-временные параметры реакции для встройки флуоресцентной метки

Температура, °С	Продолжительность, сек	Количество циклов
95°	600	1
95°	45	7
57°	180	
72°	30	
72°	1200	1

Таблица 12 – Температурно-временные параметры реакции для амплификации микросателлитного локуса с модифицированным праймером

Температура, °С	Продолжительность, сек	Количество циклов
95	600	1
95	30	40
58	40	
72	35	
72	1200	1

Флуоресцентно-меченый праймер. Для встройки флуоресцентной метки использовали праймер M-13-FAM следующей последовательностью FAM-TCACACAGGAAACAGCTATGAC. Краситель FAM присоединен к 5’- концу олигонуклеотида.

Капиллярный электрофорез. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в системе капиллярного электрофореза Нанофор 05 (НПК «Синтол», Россия) согласно руководству фирмы-изготовителя. Размеры аллелей определяли с помощью программного обеспечения GeneMarker (Version 3.0.1), по стандарту длин СД-450 (НПК «Синтол», Россия).

Перед постановкой на генетический анализатор, ПЦР-продукт, содержащий микросателлитный локус со встроенной флуоресцентной меткой, разбавляли в 4,5 раза и смешивали с продуктом амплификации, полученным на этапе №2 (предварительно разбавленным в 20 раз деионизированной водой), который примерно соответствовал ожидаемой длине аллелей микросателлита (контрольный фрагмент длиной 175 п.н.).

Секвенирование. Очистку фрагментов ДНК микросателлитного локуса Ls19 из реакционной смеси осуществляли с помощью набора Cleanup Mini согласно инструкции производителя (ЗАО «Евроген», Россия). Определение концентрации смесей осуществляли набором Spectra Q HS (компания «Raissol Bio, Россия) на приборе Qubit 3.0 (Thermo Scientific, США). Секвенирование очищенных фрагментов выполнено в компании ЗАО «Евроген». Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполнено в программе BioEdit.

2.2.11 Методика установления характера наследования микросателлитных локусов у сибирского осетра

Анализ литературных данных показывает, что для тетраплоидных видов осетровых и их отдельных локусов характерны как минимум два ключевых типа наследования: тетрасомное и диплоидизированное тетрасомное (Барминцева А. Е., 2018). При классическом тетрасомном наследовании в потомстве с равной вероятностью образуются все возможные комбинации аллелей, тогда как при диплоидизированном тетрасомном типе некоторые комбинации аллелей не возникают.

При определении характера наследования микросателлитных маркеров у сибирского осетра основной задачей являлось разграничение классического тетрасомного и диплоидизированного тетрасомного типов наследования. Для

решения этой задачи в программе Microsoft Excel была разработана модель, использующая принципы диплоидизированного тетрасомного наследования:

1. Четыре гомологичные хромосомы образуют две пары гомологов;

2. каждая пара наследуется независимо в процессе мейоза;

3. распределение аллелей на пары может различаться у разных родителей.

Варианты распределения аллелей. Для диплоидизированного тетрасомного локуса у родителя с тераплоидным геномом, содержащим четыре аллеля (условно обозначим их как A, B, C, D) возможны три варианта распределения аллелей по двум парам хромосом:

а) Вариант I: (A, B) / (C, D);

б) Вариант II: (A, C) / (B, D);

в) Вариант III: (A, D) / (B, C).

Формирование гамет. Каждая пара гомологичных хромосом передает в гамету один аллель, поэтому для каждого варианта распределения образуется по 4 типа гамет:

1. Для варианта I: AC /AD/ BC/ BD;

2. Для варианта II: AB /AD /CB/ CD;

3. Для варианта III: AB/ AC /DB/ DC.

Комбинации скрещиваний родителей. Поскольку у каждого родителя возможно три варианта распределения, общее число комбинаций при скрещивании составляет: 3 x 3=9. Схема комбинаций представлена в таблице 13.

Таблица 13 – Схема формирования комбинаций вариантов распределения аллелей для родительской пары

Самка/Самец	Вариант I	Вариант II	Вариант III
Вариант I	I / I	I / II	I / III
Вариант II	II / I	II / II	II / III
Вариант III	III / I	III / II	III / III

Формирование генотипов потомства. Для каждой комбинации вариантов распределения самка и самец продуцируют по 4 типа гамет, что дает 16 возможных генотипов потомства. В качестве примера в таблице 14 приведены все возможные

генотипы для комбинации, когда оба родителя имеют вариант распределения I (I / I).

Таблица 14 – Гаметы и возможные генотипы потомков при варианте распределения (I/I) у обоих родителей

Гаметы ♀ / ♂	AC	AD	BC	BD
AC	AACC	AACD	ABCC	ABCD
AD	AACD	AADD	ABCD	ABDD
BC	ABCC	ABCD	BBCC	BBCD
BD	ABCD	ABDD	BBCD	BBDD

Аналогичным образом рассчитывались наборы генотипов для остальных восьми комбинаций (I / II, I / III, II / I и т.д.).

Формирование полного множества теоретических генотипов. Объединение результатов по всем 9 комбинациям дает полный набор теоретически возможных генотипов потомства для конкретной родительской пары. Этот набор служил эталоном для сопоставления с экспериментальными данными.

Сопоставление с экспериментальными данными**.** Для каждого потомка был определен его генотип по исследуемому микросателлитному локусу. Затем проводилась проверка на соответствие наблюдаемого генотипа хотя бы одному из теоретических, полученных для любой из 9 комбинаций распределения. Анализ проводился последовательно для всех комбинаций.

Диплоидизированный тетрасомный тип наследования считается подтвержденным (не может быть исключен), если все потомки в экспериментальной семье могут быть отнесены к одной из девяти теоретических комбинаций, то есть все наблюдаемые генотипы потомков укладываются в одну из соответствующих матриц (рис. 11).

Выявление хотя бы одного потомка, генотип которого не соответствует ни одной из девяти теоретических комбинаций, служил основанием для предположения о полном тетрасомном типе наследования. В таком случае в мейозе участвуют все четыре гомологичные хромосомы без их предварительного распределения на пары, что приводит к появлению генотипов, выходящих за рамки описанной модели.

Родители	Самка					Самец			
	155/155/167/168					155/159/159/167			
Потомки	Комбинация								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
155/155/155/159	Нет	Нет	Нет	Да	Да	Да	Да	Да	Да
155/155/155/167	Нет	Нет	Нет	Да	Да	Нет	Да	Да	Нет
155/155/159/159	Нет	Нет	Нет	Да	Да	Нет	Да	Да	Нет
155/155/159/167	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
155/155/159/168	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
155/155/167/167	Да	Да	Нет	Да	Да	Нет	Да	Да	Нет
155/155/167/168	Да	Да	Нет	Да	Да	Нет	Да	Да	Нет
155/159/159/167	Да	Да	Нет	Да	Да	Нет	Да	Да	Нет
155/159/159/168	Да	Да	Нет	Да	Да	Нет	Да	Да	Нет
155/159/167/167	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да

Рисунок 11. Схема интерпретации результатов: пример соотнесения наблюдаемых генотипов к одной из девяти комбинаций

Таким образом, предложенная модель позволяет разграничить два типа наследования и выбрать верную интерпретацию для каждого изученного микросателлитного локуса у сибирского осетра.

2.2.12 Оценка показателей роста у экспериментальной группы сибирского осетра

Для анализа характеристик роста сибирского осетра использовано экспериментальное стадо, полученное на рыбоводном хозяйстве ООО РТФ «Диана» (Вологодская область) и содержавшееся в условиях установки замкнутого водоснабжения (УЗВ) ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Продолжительность исследования составила 64 суток. Возраст рыбы на начало эксперимента – 9 месяцев. Особи содержались в круглых рыбоводных бассейнах в одинаковых условиях: температура воды составляла 21±1°C, среднее содержание растворенного кислорода – 10,8 мг/л, плотность посадки – 20-25 кг/м^2. Все технологические факторы, влияющие на рост и выживаемость (плотность посадки, гидрохимические показатели, водообмен) поддерживались в пределах нормативных значений.

Для индивидуального учета динамики роста и развития каждой рыбе, был присвоен индивидуальный номер при помощи микрочипов Animal ID, которые вводились внутримышечно под 3 – 4 жучку спинного отдела. Активация микрочипа проводилась с помощью сканера PT-200 (Sails RFID Smart Card Technology Co., Limited, Китай).

Живая масса (W, г) определялась на электронных весах модели M-ER 326 AFU-32.1 (Mertech, Южная Корея) с точностью ±2,5 г. Взвешивание проводилось индивидуально для каждой особи на двух этапах: в начале и в конце экспериментального периода (через 120 суток).

Среднесуточный прирост (Рср.сут.) вычислялся по формуле (Правдин И. Ф., 1966):

$Рср.сут. = (m_к – m_0) / t$

где $m_к$ – конечная масса молоди, г.;

m_0 – начальная масса молоди, г.;

t – продолжительность опыта, сут.

Относительную скорость роста (SGR) рассчитывали для получения сопоставимых значений по (Prokes M. et al., 2011):

$SGR = (\ln (Wn) - \ln(W(n-1)) / t \times 100$, г %/сут.

где W1 – масса тела в текущий период, г;

Wn-1 – масса тела в предыдущий период, г;

t – продолжительность периода, сут.

Все результаты индивидуальных промеров экспериментальных рыб, нормы кормления, а также гидрохимические показатели воды систематизированы в электронной базе данных (Зиновьева и др., 2024).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Разработка мультиплексной тест - системы микросателлитных локусов для генетической паспортизации сибирского осетра

Проведение микросателлитного анализа у сибирского осетра сопряжено со значительными методическими трудностями, обусловленными особенностями его генома. В настоящем исследовании применялась функциональная шкала плоидности, согласно которой сибирский осетр рассматривается как функциональный тетраплоид, что теоретически предполагает наличие до четырех аллелей на один локус – в отличие от диплоидных организмов, где их количество не превышает двух. Однако для осетровых рыб характерна сложная геномная архитектура, при которой плоидность отдельных хромосом или их участков может варьировать, не соответствуя общей тетраплоидности. Отклонения могут проявляться как в сторону уменьшения (ди- или трисомное состояние), так и в сторону увеличения (пента или гексасомное состояние) числа гомологов.

Примером этого явления послужил микросателлитный локус *AoxD161*, представленный на рисунке 12. У отдельных особей сибирского осетра для этого локуса было выявлено до пяти аллелей, что указывает либо на дупликацию данного локуса, либо на более высокий уровень плоидности хромосомы, на которой он расположен.

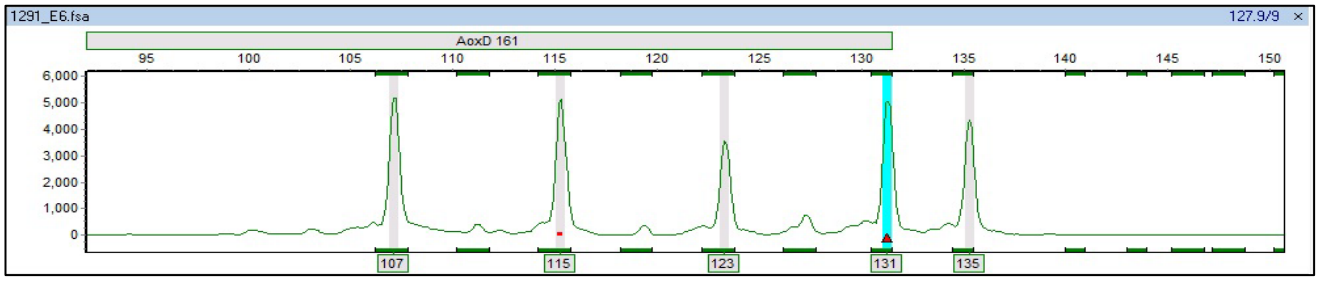


Рисунок 12. Электрофореграмма микросателлитного локуса *AoxD161*, демонстрирующая пять аллелей (107,115, 123, 131, 135 п.н) у сибирского осетра

В ходе настоящего исследования было протестировано более 48 микросателлитных локусов, описанных в научной литературе для различных видов осетровых рыб. Значительная их часть (более 60 %) была отбракована по

различным причинам. Наиболее распространенной причиной исключения локусов стала неспецифичная амплификация, наблюдавшаяся, в частности, для локусов: *Ag01, Aox45, Agu36* и *Ag22.* Высокий уровень фонового шума и наличие множества посторонних пиков делали невозможным однозначное выделение истинных аллельных вариантов (рис. 13).

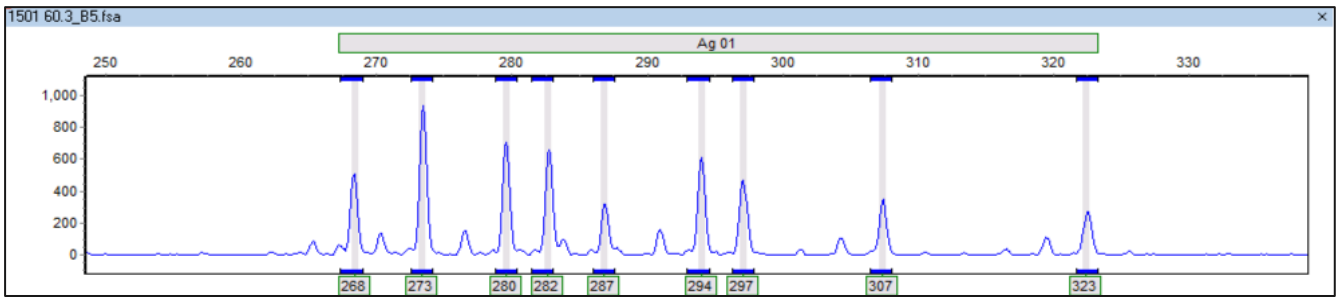


Рисунок 13. Электрофореграмма локуса *Ag01* с неспецифичной амплификацией (множественные пики)

Тесно связанной с этой проблемой оказалась невозможность точного определения дозы аллеля – важного параметра для корректного генотипирования полиплоидных видов. У локусов: *Spl113, Ls39, Afu68b* форма пиков и их соотношение не соответствовали ожидаемым для тетрасомного наследования, что исключало возможность количественной интерпретации данных (рис. 14).

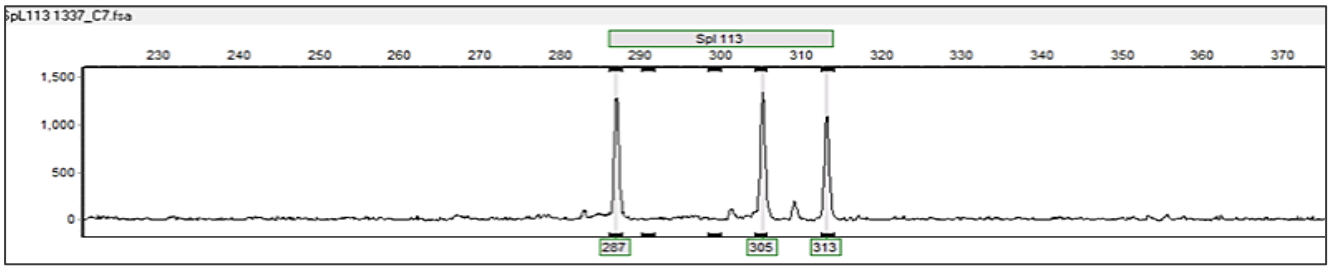
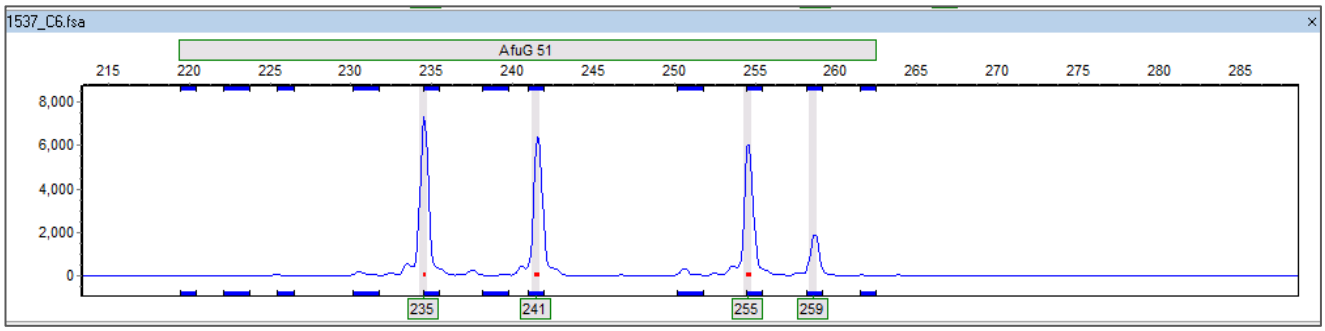


Рисунок 14. Электрофореграмма локуса *Spl113:* три аллеля равной интенсивности сигнала

Локусы: *Aox9, Agu56, Agu54 и Ls68* продемонстрировали мономорфные паттерны у протестированных особей, что делает их непригодными для задач популяционно - генетического анализа и видовой идентификации. В ряде случаев (например, для локуса *Agu59*) наблюдался аномальный профиль с тремя

равновысокими аллелями, что не позволяло достоверно определить соотношение пиков. Еще одной проблемой стало вероятное присутствие нуль-аллелей, предположительно выявленное для локуса *AfuG51* (рис. 15).



Примечание: 235 п.н., 241 п.н., 255 п.н.– аллели с прмерно одинаковой эффективностью синтеза в ПЦР, четвертый пик (259 п.н.) с низким значением флуоресценции вероятно соответствует аллелю с измененным сайтом отжига праймера.

Рисунок 15. Определение нуль-аллеля на примере локуса *AfuG51*

В результате тщательного отбора для генетической паспортизации сибирского осетра была разработана тест-система, состоящая из трех мультиплексных панелей. В совокупности они включают 12 высокополиморфных микросателлитных локусов, характеристики которых представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Характеристика выбранных микросателлитных маркеров для генетического анализа сибирского осетра

Локус	**Метка**	**Диапазон аллелей по собственным данным**	**Последовательность праймеров 5'–3'**
1 панель			
An20	FAM	135-190	F5'–AATAACAATCATTACATGAGGCT–3'
			R5'–TGGTCAGTTGTTTTTTTATTGAT–3'
Aru18	R6G	130-145	F5'–CCTGGAACACGTCCAGTTTT –3'
			R5'–TGGGTGAATGTTTTGGTGTG–3'
Agu38	ROX	100-120	F5'–ACTGGGGTTGAAGGACAGTG–3'
			R5'–TCCGTCTCATGTCCAAGGGTA–3'
As043	TAMRA	190-280	F5'–CGACCCTAGAAGGGTTCAGA–3'
			R5'–TCCTGCAACATGAAGTGAGC–3'
2 панель			
Ag49a	FAM	175-225	F5'–TGTTATCTGCTCTGATATTGATTCG–3'
			R5'–CGTTTTAAAGTTTGAACGGCA–3'
Agu37	R6G	120-140	F5'–ACATGGTAGCAAAATCCCAA–3'
			R5'– CAGCAAGCTTAGATGCATGG–3'

Локус	Метка	Диапазон аллелей по собственным данным	Последовательность праймеров 5'–3'
Ls19	TAMRA	120-160	F5'–CATCTTAGCCGTCTGGGTAC–3'
			R5'–CAGGTCCCTAATACAATGGC–3'
Agu41	ROX	170-230	F5'–AAGACAAACAGTGGCCCAAC–3'
			R5'–CAATGGCAGGTGCTACTGAA–3'
3 панель			
AcR13V	R6G	100-128	F5'–AGTAGTATTTTTAGTAGTCAGCGTA–3'
			R5'–CGCTGGTAAACCATGACATATG–3'
Ag18	FAM	220-250	F5'–CATCAAAGATTTTAGAAGGACATGTAG–3'
			R5'– TGTGCAATGCAATCAGAACA–3'
Ag10	R6G	225-290	F5'–AACAAGTTCTTACCTCGATTTTGG–3'
			R5'–GAGATTTGAACAAGACAGGAGGA–3'
Afu39	ROX	120-140	F5'–TTCTGAAGTTCACACATTG–3'
			R5'–ATGGAGCATTATTGGAAGG–3'

Для создания мультиплексной панели для сибирского осетра был применен следующий подход: в одну мультиплексную ПЦР-реакцию объединялось не более четырех локусов. Каждый локус в панели маркировался уникальной флуоресцентной меткой (FAM, R6G, TAMRA, ROX). Такое ограничение по количеству маркеров в одной реакции является необходимым для обеспечения четкого разрешения аллельных пиков и, что наиболее важно, для точной количественной оценки дозы каждого аллеля. Увеличение числа локусов в панели приводит к наложению спектров флуоресценции и усложнению профиля, повышая риск ошибочной интерпретации данных.

Примером успешного мультиплексирования в рамках одной реакции, демонстрирующий четкое аллельное разрешение и различимые соотношения высот пиков (дозы аллелей), представлен на рисунке 16.

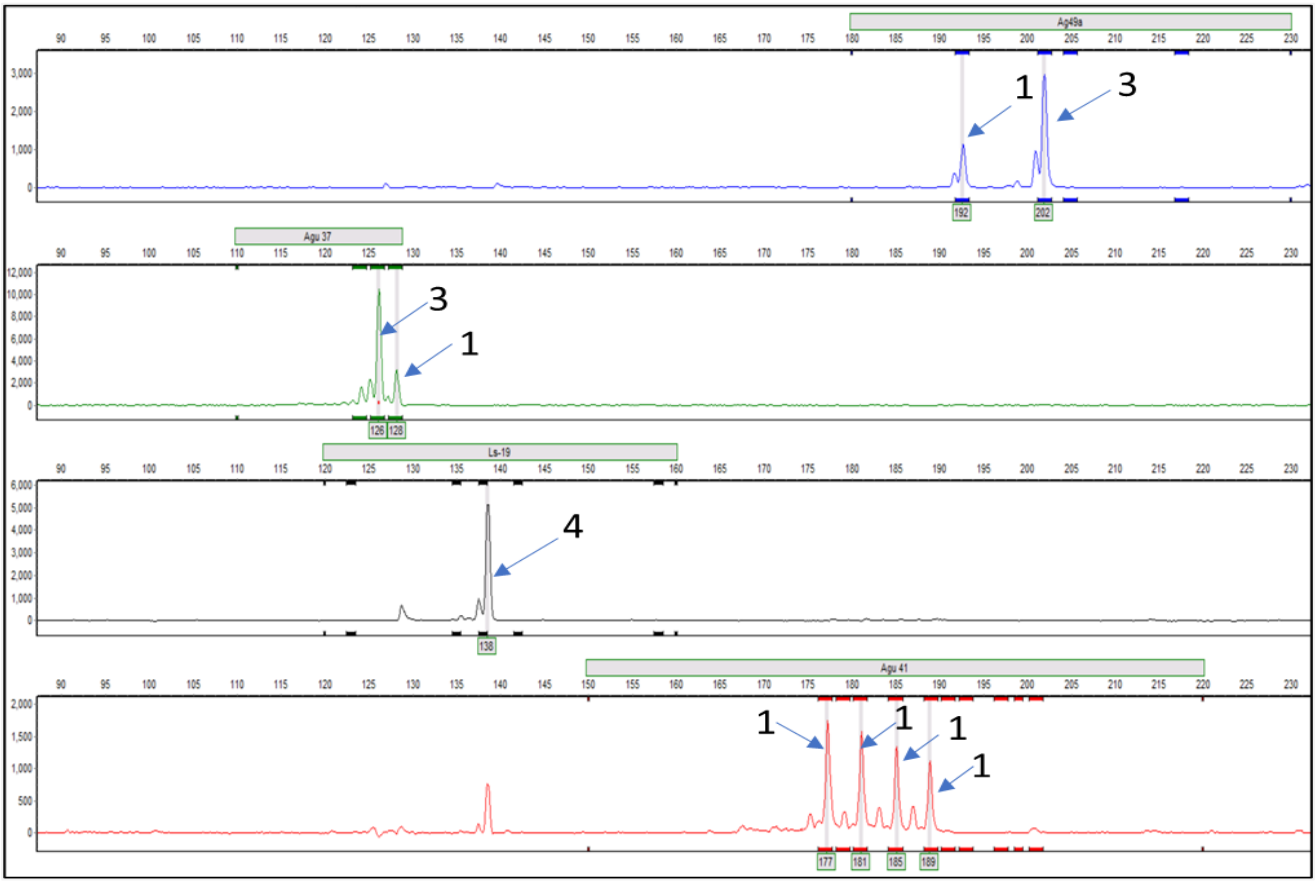
Таким образом, при разработке тест-системы для сибирского осетра были учтены важные особенности:

– возможность проявления различного уровня плоидности (от 2n до 6n) для разных локусов, наличие более четырех аллелей у одной особи указывает на дупликацию локуса или более высокий уровень плоидности, что делает такой локус непригодным для анализа происхождения;

– высокий риск образования нулевых аллелей (подобный аллель возникает при появлении мутации на фланговой последовательности микросателлитного локуса, к которой подобран один из праймеров, при этом амплификация аллеля подавляется);

– необходимость учета эффекта дозы аллеля (количественного соотношения между аллелями);

– сложность установления родственных связей из-за полиплоидности (для эффективного использования данных микросателлитного анализа необходим учет дозы каждого аллеля).



Примечание: стрелками указана доза аллеля для каждого микросателлитного локуса.

Рисунок 16. Пример мультиплексирования локусов *Ag49a, Agu37, Ls19* и *Agu41*(2 панель)

Проведенное исследование подтвердило, что разработка эффективной системы микросателлитного анализа для сибирского осетра требует обязательного учета его тетраплоидной природы и связанных с этим геномных особенностей. Из

48 протестированных локусов более 60% были отбракованы из-за несоответствия строгим критериям, предъявляемым к маркерам для полиплоидных видов. Наиболее частыми причинами отбраковки стали отклонения от ожидаемого числа аллелей (более четырех на особь, как в случае *AoxD161*), наличие нуль-аллелей (*Agu15*), неспецифичная амплификация (*Ag01, Aox45*) и невозможность определения дозировки аллелей (*Spl163, Ls39*). Эти сложности полностью согласуются с данными других авторов, отмечающих высокую частоту дупликаций и геномных перестроек и незавершенность процессов редиплоидизации у осетровых, что существенно затрудняет стандартный микросателлитный анализ (Rajkov J. et al., 2014; Барминцева А. Е., 2018; Havelka M. et al., 2016). Высокая доля отбракованных маркеров подчеркивает необходимость тщательной апробации каждого локуса при работе с полиплоидными геномами, а не прямого переноса панелей, разработанных для диплоидных организмов или даже для других, пусть и близкородственных, видов осетровых.

Итоговая тест-система, включающая 12 локусов, распределенных по трем мультиплексным панелям, позволяет не только идентифицировать аллели, но и благодаря ограниченному числу маркеров в одной реакции, достоверно оценивать их дозировку. Возможность количественной оценки соотношения аллелей является важным требованием для тетраплоидного анализа, поскольку именно дозировка позволяет корректно интерпретировать генотипы особей с тремя или четырьмя аллелями и использовать эти данные для установления родства и оценки генетического разнообразия.

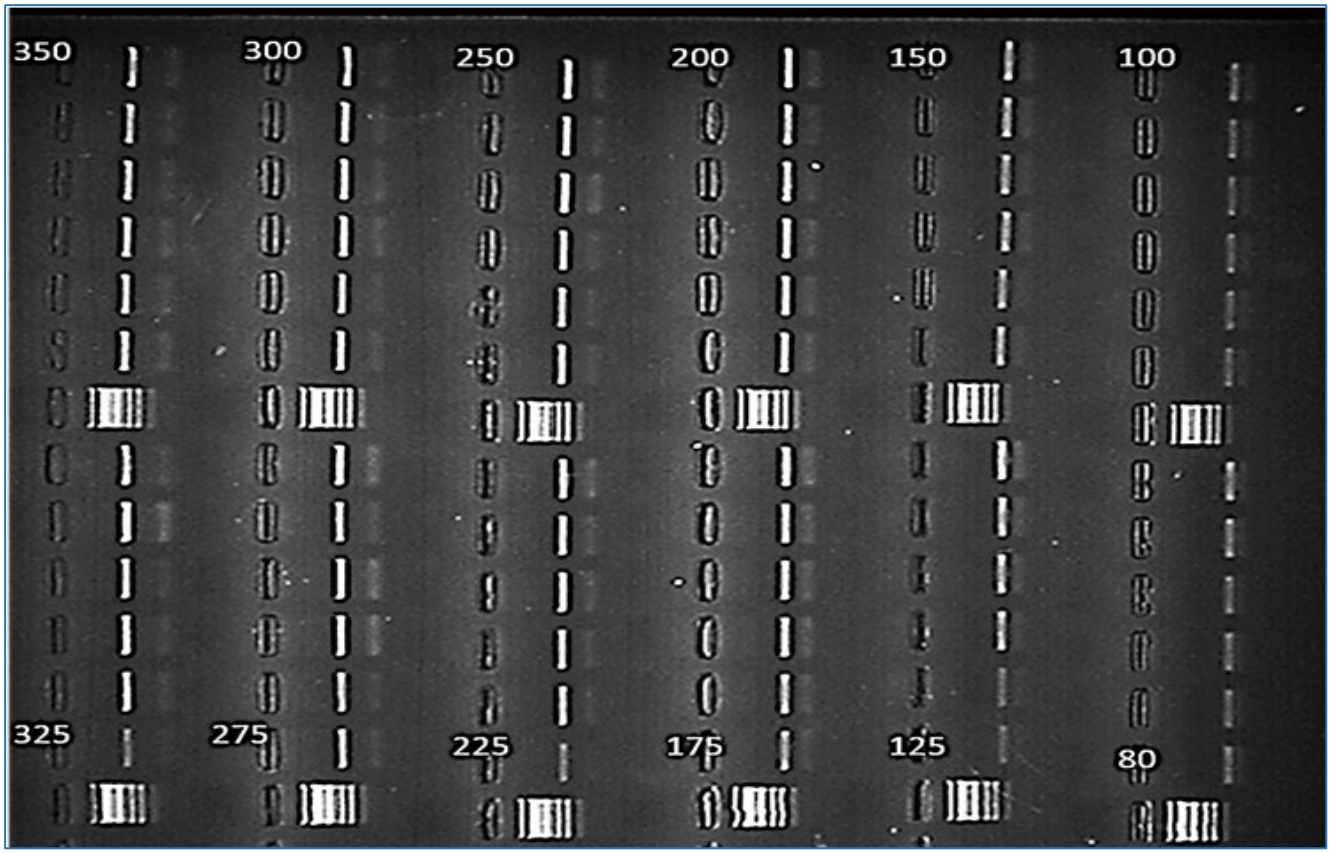
3.2 Разработка метода стандартизации длин аллелей микросателлитных локусов

В рамках диссертационного исследования разработана и успешно апробирована референсная система контроля длин микросателлитных локусов для работы с сибирским осетром. Технологическая схема состоит из 5-ти этапов.

1. Синтез набора фрагментов ДНК заданной длины. С помощью праймеров, указанных в таблице 8 из консервативной для осетровых видов рыб

области мтДНК в два этапа было синтезировано 12 фрагментов ДНК известного размера. На первом этапе с использованием праймеров: F1-Ac-R-350 и R-Ac-R-80-350+M13-acip был получен наибольший фрагмент (350 п.н.), который после разведения в 200 раз послужил матрицей для ПЦР с единым обратным праймером R-Ac-R-80-350+M13-acip и набором прямых праймеров F2-F12.

В результате были получены ампликоны следующих длин: 80 п.н., 100 п.н., 125 п.н., 150 п.н., 175 п.н., 200 п.н., 225 п.н., 250 п.н., 275 п.н., 300 п.н., 325 п.н., 350 п.н. Проверка полученных ПЦР-продуктов в 2,5%-ом агарозном геле показала стабильную амплификацию и практически полное отсутствие неспецифичных продуктов (рис. 17).



Примечание: фрагменты:350 п.н., 325 п.н., 300 п.н., 275 п.н., 250 п.н., 225 п.н., 200 п.н., 175 п.н., 150 п.н., 125 п.н., 100 п.н., 80 п.н.

Рисунок 17. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов ДНК заданной длины в 2,5 % агарозном геле

2. Интеграция флуоресцентной метки в референсные фрагменты. Далее была проведена процедура интегрирования флуоресцентной метки FAM в

полученные ампликоны при помощи гибридизации флуоресцентно-меченого праймера M-13-FAM (FAM-TCACACAGGAAACAGCTATGAC) на сайте посадки, имеющемся в составе обратного праймера R-Ac-R-80-350+M13-acip и последующего удлинения *Taq*-полимеразой цепи ДНК (рис. 18). Реакцию проводили в течение 7 циклов с удлиненной стадией отжига (180 сек) для обеспечения эффективной гибридизации.

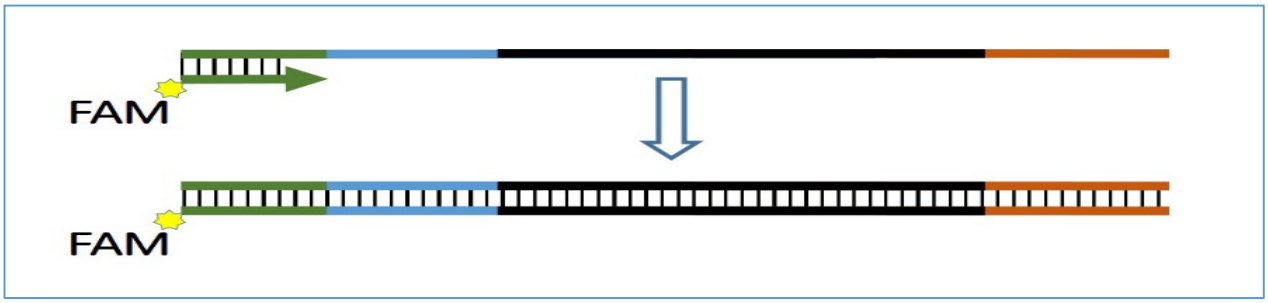
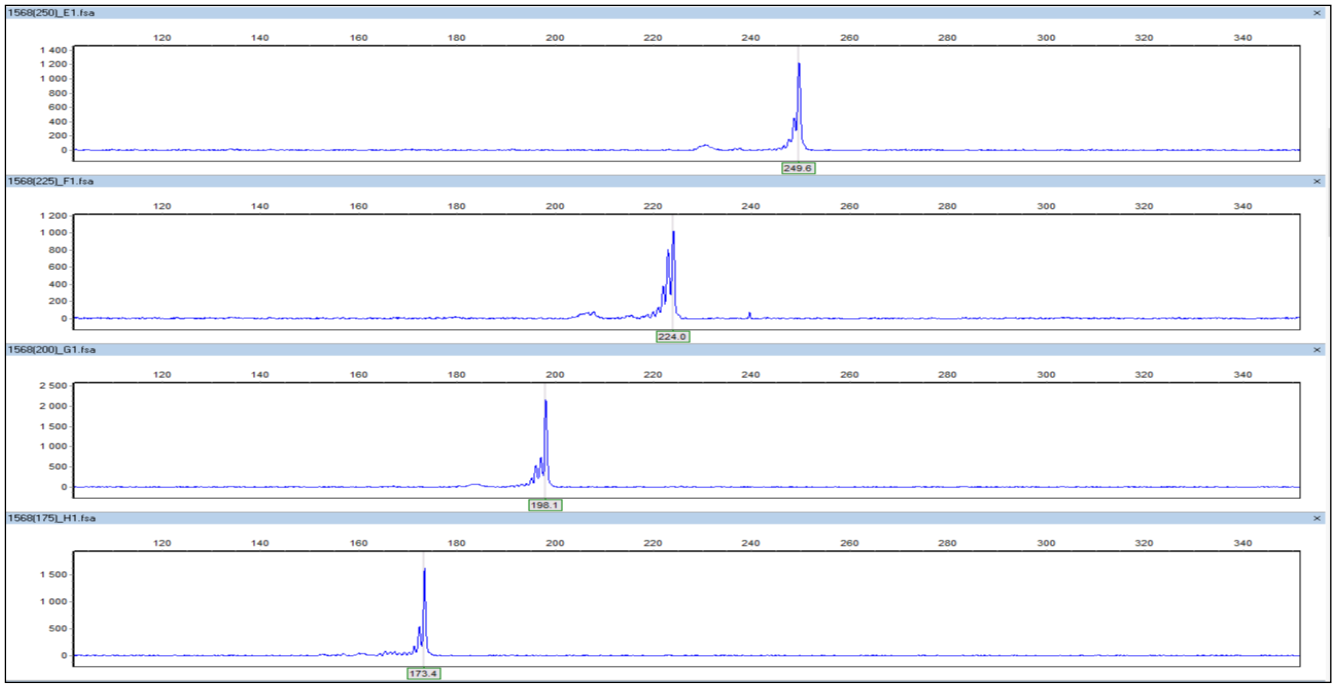


Рисунок 18. Схема встройки флуоресцентной метки в ампликон

Эффективность встройки флуоресцентной метки FAM оценивали методом капиллярного электрофореза ПЦР-продукта. Выполненный фрагментный анализ подтвердил наличие флуоресцентно-меченых ампликонов в достаточной концентрации (рис. 19).



Примечание: на рисунке представлены ампликоны размером 250 п.н., 225 п.н., 200 п.н., 175 п.н.

Рисунок 19. Проверка качества встройки флуоресцентной метки FAM в ампликоны известной длины

3. Получение меченого ампликона микросателлитного локуса *Ls19*. Аналогичным образом произведена наработка ПЦР-продукта локуса *Ls19*, имеющего на фланге дополнительный сайт посадки флуоресцентно-меченого праймера M-13-FAM. Использовали ДНК представителя сибирского осетра, являющегося гомозиготным по данному локусу (образец № АВ1324 по базе данных ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста). После получения амплификата была выполнена процедура интегрирования в ПЦР-продукт флуоресцентной метки FAM посредством гибридизации праймера M-13-FAM и последующего удлинения прямой цепи ДНК.

4. Калибровка длины микросателлитного локуса с использованием референсных фрагментов. Для оценки точности определения длины микросателлитного локуса был проведен фрагментный анализ, при выполнении которого ампликоны известной длины со встроенной флуоресцентной меткой FAM смешивали с аналогичным ПЦР-продуктом микросателлитного локуса *Ls19*. В качестве контроля был выбран референсный фрагмент длиной 175 п.н., наиболее близкий по размеру к ожидаемой длине аллелей локуса *Ls19*.

На данном этапе производилась визуальная оценка смещения длин анализируемых фрагментов при их определении по коммерческому стандарту длин (SD-450). Данная процедура представлена на рисунке 20.

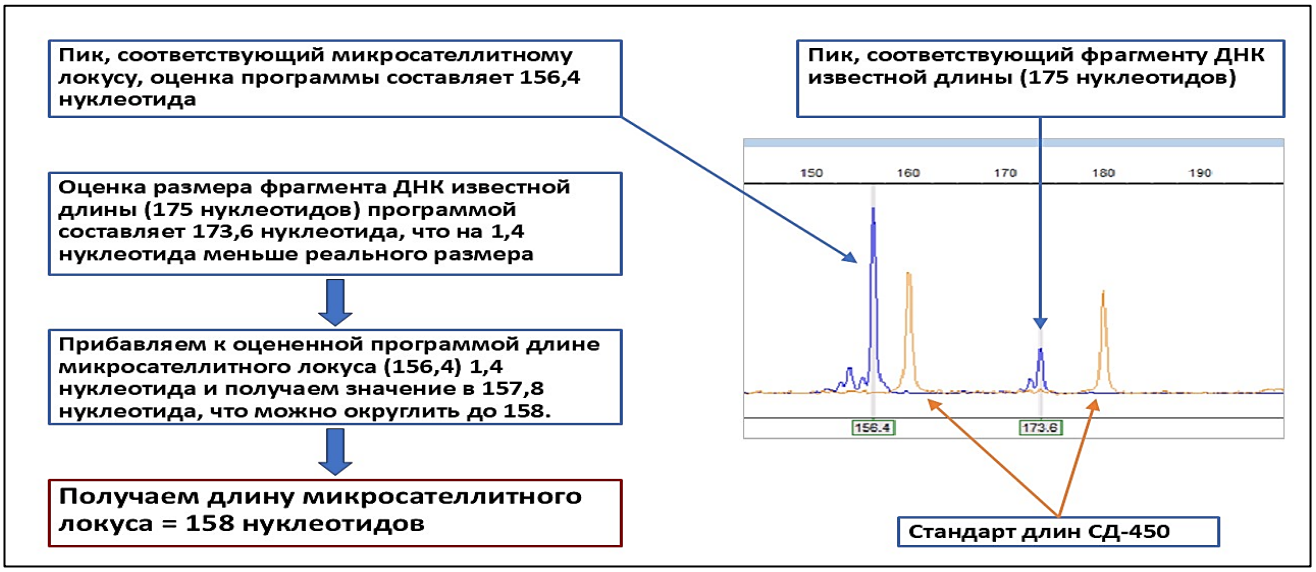


Рисунок 20. Сравнение определения длин микросателлитного локуса по стандарту длин и синтезированному фрагменту известной длины

Выполненная оценка позволила скорректировать длину тестируемого микросателлитного локуса *Ls19* и получить значение в 158 нуклеотидов. Ошибка определения длины аллеля микросателлитного локуса с помощью разработанного метода составила 0,2 нуклеотида, в то время как простое нормирование по стандарту длин показывает сдвиг на 1,4 нуклеотида.

5. Верификация результатов методом секвенирования. Для определения реальной длины микросателлитного локуса было выполнено контрольное секвенирование локуса *Ls19* у того же представителя сибирского осетра (образец № AB1324). Чтение ампликона происходило как с прямого, так и с обратного праймеров, что позволило расшифровать нуклеотидную последовательность локуса и определить его длину. Для этого было выполнено выравнивание прямого и обратного сиквенсов. На полученной последовательности были определены сайты посадки праймеров, после чего посчитана длина фрагмента ДНК (от начала прямого праймера до конца обратного, исключая +A артефакты, связанные с включением *Taq*-полимеразой дополнительного аденина в конце достроенной цепи ДНК). Длина ампликона составила 158 п.н., а без учета искусственно добавленного сайта посадки праймера M-13-FAM – 136 нуклеотидов.

Принимая во внимание, что стандартный прямой праймер *Ls19*-F (CATCTTAGCCGTCTGGGTAC) был увеличен с 5’– конца на 22 нуклеотида для включения сайта посадки меченого праймера M-13-FAM, то длина тестируемого микросателлитного аллеля при использовании стандартных для данного локуса праймеров *Ls19*-F и *Ls19*-R (CAGGTCCCTAATACAATGGC) составит 158 – 22 = 136 нуклеотидов, что также подтверждается контрольным секвенированием. Таким образом, длина тестируемого микросателлитного локуса была верно определена с помощью разработанной системы (рис 21).



Рисунок 21. Выравнивание нуклеотидных последовательностей микросателлитного локуса *Ls19*, полученное при секвенировании с прямого и обратного праймеров (образец № АВ1324)

Из практики фрагментного анализа известно, что наибольшее влияние на смещение длин аллелей микросателлитных локусов оказывает применение разных флуоресцентных меток или даже разных партий синтеза одного красителя. Преимущество разработанного метода заключается в минимизации данного эффекта путем калибровки длин аллелей при помощи заранее известного идентичного флуоресцентного красителя, общего, как для тестируемых локусов, так и для референсных фрагментов ДНК. Сравнение значений длин референсных фрагментов ДНК, оцененных коммерческим стандартом длин с их реальным размером, позволяет выявить и количественно определить погрешность при проведении фрагментного анализа.

При условии наличия третьего микросателлитного праймера (с сайтом посадки для отдельного меченого праймера вместо собственной флуоресцентной

метки) возможно быстрое создание референсных образцов, наработка контрольных аллелей, определение реальных длин аллелей различных по размеру локусов в одном капилляре за один запуск прибора, быстрое определение погрешности измерений в начале работы с новым локусом. Фактически, имея заранее синтезированный набор флуоресцентно-меченых фрагментов ДНК известных длин, а также аликвоту меченого праймера, с помощью которого была произведена встройка красителя, за две реакции амплификации и последующего фрагментного анализа возможно получить контрольный образец с известными длинами аллелей. Данная технология может применяться к образцам, обладающими большим количеством аллелей или имеющим продукты неспецифичной амплификации, что может представлять трудности при секвенировании.

3.3 Анализ характера наследования микросателлитных локусов

Сибирский осетр является представителем полиплоидных видов осетровых, прошедших в ходе эволюции как минимум два раунда дупликации всего генома. В настоящее время его геном функционирует как тетраплоидный, хотя отдельные локусы могут сохранять следы более древней октаплоидии, возникшей на этапе перехода от 60 до 120 хромосом.

Ввиду обозначенной особенности генома сибирского осетра в ходе исследования был проанализирован характер наследования 12-ти отобранных микросателлитных локусов. Характер наследования выявляли на основании сопоставления генотипов родителей и потомков экспериментальных семей, информация о которых представлена в таблице 3 (см. раздел «Материалы и методы исследований»). Результаты обобщены в таблице 16.

Хромосомная локализация каждого локуса указана относительно генома стерляди (номера хромосом с обозначением ACR – *Acipenser ruthenus*). С учетом того, что геном сибирского осетра функционирует как тетраплоидный, интерпретация типов наследования проводилась в рамках моделей дисомного (2n), тетрасомного (4n) и диплоидизированного тетрасомного наследования.

Таблица 16 – Хромосомная локализация и характер наследования исследованных микросателлитных локусов

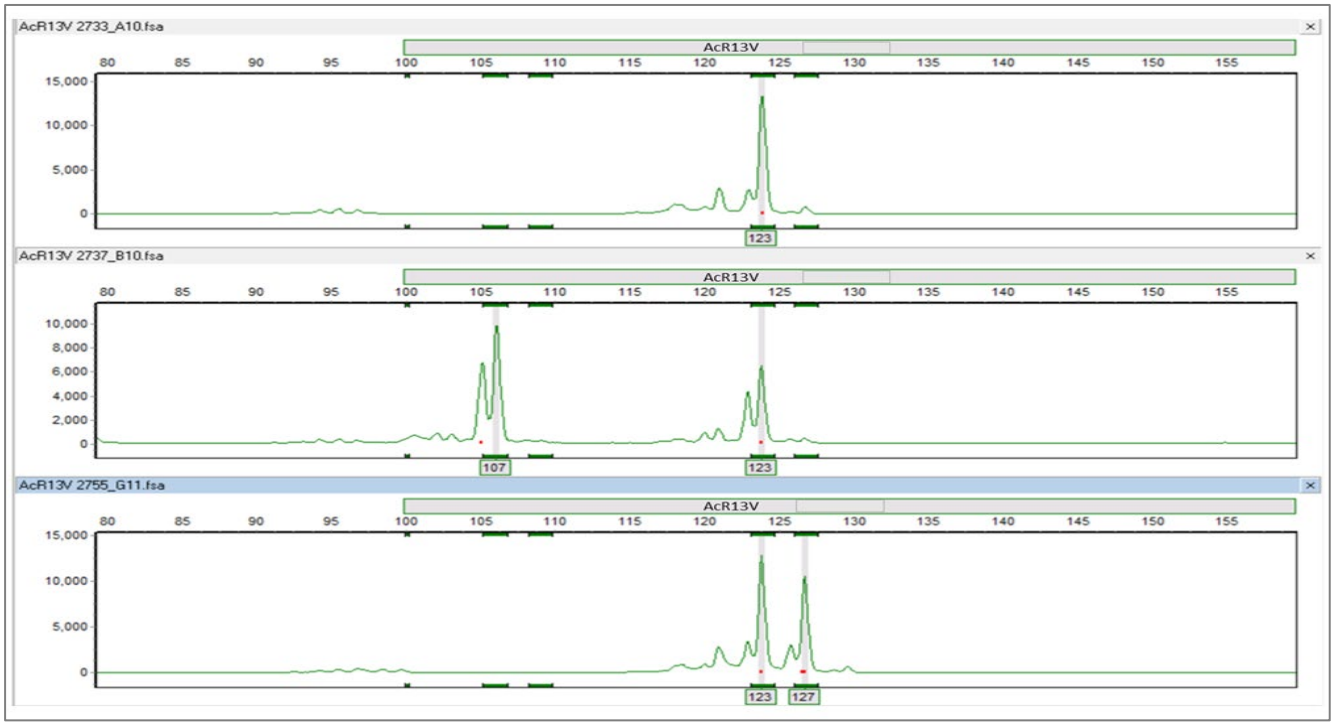
Локус	Хромосома	Номер последовательности в GenBank (NCBI)	Характер наследования
An20	10 ACR*	NC_081198.1	Не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования (4n)
Aru18	9 ACR	NC_081197.1	Не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования (4n)
Agu38	6 ACR	ASM1064508v1	Не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования (4n)
As043	54 ACR	NC_081242.1	Не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования (4n)
Ag49a	**19 ACR**	**NC_081207.1**	**Тетрасомный (4n)**
Agu37	17 ACR	NC_081205.1	Не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования (4n)
Ls19	14 ACR	ASM1064508v1	Не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования (4n)
Agu41	2 ACR	NC_081190.1	Не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования (4n)
AcR13V	**13 ACR**	**NC_081201.1**	**Дисомный (2n)**
Ag18	15 ACR	NC_081203.1	Не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования (4n)
Ag10	20 ACR	NC_081208.1	Не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования (4n)
Afu39	17 ACR	NC_081205.1	Не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования (4n)

Примечание: нумерация соответствует гомологичным хромосомам генома стерляди

При анализе характера наследования для микросателлитных локусов *An20* (хромосома 10 ACR), *Aru18* (9 ACR), *Agu38* (6 ACR), *As043* (54 ACR), *Agu37* (17 ACR), *Ls19* (14 ACR), *Agu41* (2 ACR), *Ag18* (15 ACR), *Ag10* (20 ACR), *Afu39* (17 ACR) в экспериментальных группах были зафиксированы случаи, когда в выборке потомков, принадлежащих к определенных родительским парам, у всех особей наблюдалась одна из девяти возможных комбинаций генотипов, соответствующей диплоидизированной тетрасомной модели наследования. Следовательно, в ходе эволюции у сибирского осетра для этих локусов, вероятно, произошла частичная диплоидизация: аллели могут распределяться как по четырем гомологичным хромосомам, так и по двум – в зависимости от конкретного мейотического события или участка хромосомы.

В отличие от большинства проанализированных локусов, у *Ag49a* не выявлены рассматриваемые комбинации генотипов, характерные для диплоидизированного тетрасомного типа. Для хромосомы 19 ACR (NC_081207.1), на которой локализован микросателлитный локус *Ag49a*, установлен тетрасомный тип наследования. Вероятно, этот участок генома сибирского осетра сохранил тетрасомный тип наследования, возникший в результате полиплоидизации. В мейозе все четыре гомологичные хромосомы участвуют в расщеплении аллелей, что приводит к характерному для тетраплоидов распределению генотипов у потомства.

Для микросателлитного локуса *AcR13V,* расположенного на хромосоме 13 (ACR) согласно референсному геному стерляди, был определен дисомный тип наследования на основе анализа экспериментальных семей (рис. 22).



Примечание: выявленные генотипы – 123/123; 107/123; 123/127.

Рисунок 22. Электрофореграмма микросателлитного локуса *AcR13V* у трех особей сибирского осетра, демонстрирующих генотипы, характерные для дисомного наследования

В таблице 17 приведены данные скрещивания, в котором оба родителя несут по два различных аллеля: самка имеет генотип 123/127, самец – 106/109. При

тетрасомном наследовании для данного скрещивания теоретически ожидаются девять возможных генотипов потомков с частотами от 0,028 до 0,444. Однако в действительности из девяти теоретически возможных классов были обнаружены только четыре, а именно те, которые соответствуют диплоидным сочетаниям: 106/123, 106/127, 109/123 и 109/127. Пять генотипов, выделенные в таблице (106/106//123/127, 106/109/123/123, 106/109/123/127, 106/109/127/127, 109/109/123/127), полностью отсутствуют в потомстве. Почти 89 % теоретически ожидаемых при тетрасомном наследовании генотипов не реализовались в эксперименте.

Таблица 17 – Анализ наследования локуса *AcR13V* в экспериментальных группах

Семья	Генотипы родителей	Генотипы потомков	Частота генотипов	
			Теоретическая	Наблюдаемая
♀	123/123/127/127 **(123/127)**	106/106/123/123 **(106/123) -** 6 лич.	0,028	0,261
		106/106/123/127	**0,111**	**0,000**
		106/106/127/127 **(106/127) - 7** лич.	0,028	0,304
		106/109/123/123	**0,111**	**0,000**
♂	106/106/109/109 **(106/109)**	**106/109/123/127**	**0,444**	**0,000**
		106/109/127/127	**0,111**	**0,000**
		109/109/123/123 **(109/123) -** 5 лич.	0,028	0,217
		109/109/123/127	**0,111**	**0,000**
		109/109/127/127 **(109/127) -** 2 лич.	0,028	0,087

Примечание: в скобках указаны соответствующие диплоидные генотипы, сокращение *«лич.»* означает личинки (количество особей).

Наблюдаемое распределение соответствует менделевскому расщеплению для диплоидного организма: два родительских аллельных варианта (123/127 и 106/109) дают четыре возможных диплоидных генотипа: 106/123, 106/127, 109/123, 109/127, что может указывать на дисомный тип наследования локуса *AcR13V* у сибирского осетра.

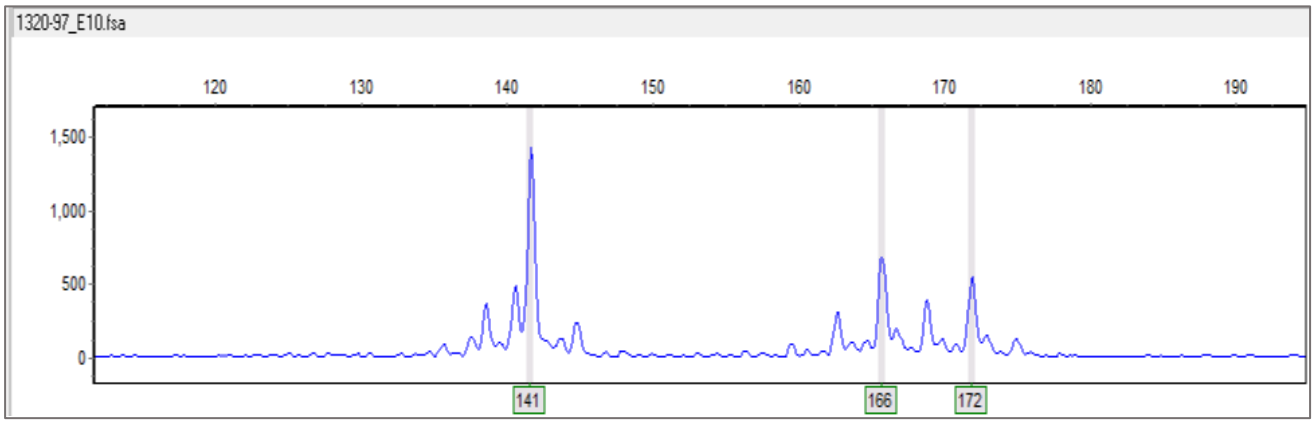
В связи с этим возникла необходимость выяснить, является ли выявленный дисомный характер наследования специфической особенностью только данного

микросателлитного локуса или же отражает общее состояние всей хромосомы 13, на которой он расположен (согласно референсному геному стерляди). Для решения этой задачи был выполнен анализ дополнительных микросателлитных маркеров, локализованных на данной хромосоме: *AcR13-82, AcR13-2, AcR13-45, AcR13-97.* Для этого были разработаны праймеры к исследуемым локусам, при этом в последовательность прямых праймеров с 5' включен сайт посадки меченого праймера М-13 (табл. 18).

Таблица 18 – Характеристика локусов, локализованных на 13-й хромосоме (13 ACR)

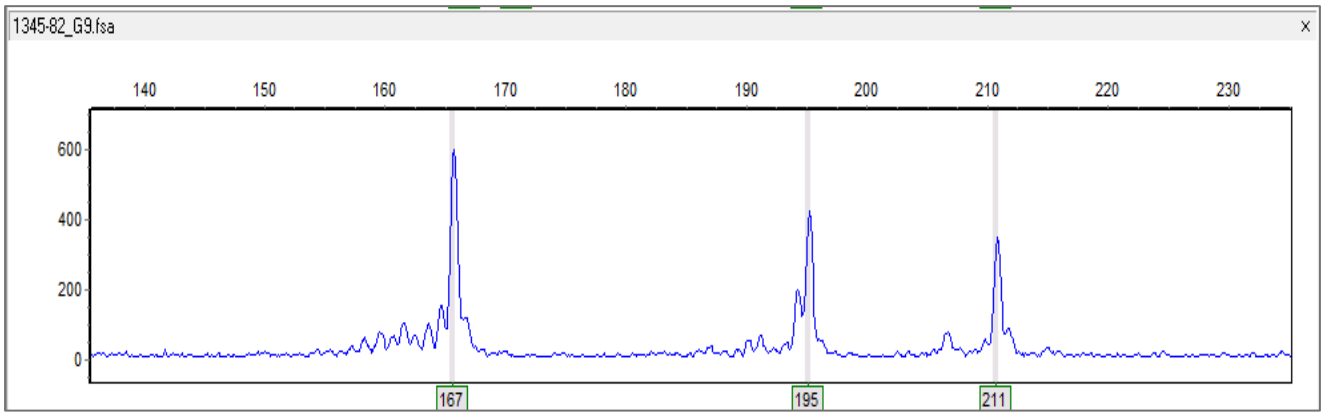
Локус	**Последовательность праймеров 5' – 3'**
AcR13-82	F: TCACACAGGAAACAGCTATGACTTTATTACACCCACTGACGATGG
	R: TATGGACGGTACAATGGTATTTGT
AcR13-2	F: TCACACAGGAAACAGCTATGACACACAAACACAACAGGAGCCAC
	R: GTTCAGGTGGTGTTTGTGACAG
AcR13-45	F: TCACACAGGAAACAGCTATGACTACCCTATTTGCAAGACTGAACG
	R: ACGACATTTGTGACGAAATTAAACG
AcR13-97	F: TCACACAGGAAACAGCTATGACAAAACATTTGGCTGCCTTAGACC
	R: CGATTTGATCTATTTGTCTAAGCTG

Фрагментный анализ указанных локусов у ранее протестированных особей сибирского осетра с дисомным наследованием по микросателлитному локусу *AcR13V,* выявил типичные тетраплоидные генетические профили– у отдельных особей наблюдалось наличие до четырех аллелей (рис. 23, 24).



Примечание: наблюдаемый генотип – 141/141/166/172.

Рисунок 23. Электрофореграмма локуса *AcR13*-97 с выявленными тетрасомными генетическими профилями



Примечание: наблюдаемый генотип – 167/167/195/211.

Рисунок 24. Электрофореграмма локуса *AcR13*-82 с выявленными тетрасомными генетическими профилями

Таким образом, хромосома, гомологичная 13-й хромосоме стерляди, в геноме сибирского осетра не сохранила целостность. Отдельные ее участки характеризуются тетрасомным типом наследования, тогда как в отношении другого участка наблюдается диплоидное наследование. Это позволяет предположить, что участок, в котором расположен локус *AcR13V,* либо входит в состав диплоидной хромосомы, либо представляет собой отдельную микрохромосому.

3.4 Установление родства в экспериментальных семьях на основе микросателлитного анализа

Для подтверждения родственных связей между производителями и потомками в экспериментальных семьях сибирского осетра был проведен анализ наследования 12 микросателлитных локусов. Идентификация родительской пары для конкретного потомка проводилась путем поиска такой комбинации родителей, у которых по каждому локусу можно выделить по два аллеля, полностью соответствующих четырем аллелям потомка. Критерием успешного отнесения потомка к конкретной паре являлось выполнение этого условия по всем 12-ти проанализированным маркерам. Генотипы всех исследуемых особей представлены в таблицах 19 – 20. В качестве примера ниже рассмотрено установление отцовства для потомка (F_AB2784).

Таблица 19 – Генотипы потенциальных родителей и потомка F_AB2784 по 12-ти микросателлитным локусам

1 панель																
	An20				***Agu38***				***Aru18***				***As043***			
♀2774	**155**	**159**	**159**	**167**	**110**	**112**	**112**	**114**	**137**	**137**	**137**	**139**	**250**	**250**	**258**	**274**
♂2773	155	155	167	168	108	108	108	108	137	137	139	139	242	262	274	278
♂2776	**155**	**159**	**163**	**167**	**108**	**108**	**108**	**108**	**137**	**137**	**137**	**139**	**250**	**266**	**270**	**270**
♂2781	159	159	167	167	108	110	112	112	137	137	137	137	194	250	254	270
2784	155	159	163	167	108	108	112	112	137	137	137	137	250	270	270	274
2 панель																
	Ls19				***Ag49a***				***Agu37***				***Agu41***			
♀2774	**138**	**138**	**142**	**142**	**192**	**196**	**202**	**204**	**124**	**126**	**126**	**126**	**191**	**191**	**193**	**201**
♂2773	123	135	138	157	196	202	202	204	126	126	126	126	177	181	191	201
♂2776	**135**	**138**	**142**	**142**	**202**	**202**	**202**	**204**	**124**	**126**	**126**	**128**	**189**	**191**	**191**	**201**
♂2781	135	138	138	138	192	196	202	204	124	124	126	128	181	191	193	201
2784	135	138	142	142	192	202	204	204	124	126	126	126	189	191	191	191
3 панель																
	AcR13V		***Ag18***				***Ag10***				***Afu39***					
♀2774	**123**	**127**	**228**	**228**	**236**	**236**	**250**	**258**	**275**	**283**	**125**	**125**	**125**	**128**		
♂2773	123	127	228	228	240	240	254	254	258	266	128	140	143	143		
♂2776	**123**	**123**	**228**	**228**	**228**	**236**	**250**	**250**	**254**	**266**	**125**	**125**	**128**	**128**		
♂2781	123	127	228	236	236	236	242	250	266	283	125	125	125	128		
2784	123	123	228	228	228	236	250	258	266	283	125	125	125	128		

По результатам анализа единственным совместимым отцом для потомка F_AB2784 определен самец 2776. Установлено, что самец 2773 исключается из числа возможных отцов по локусам *An20, As043, Agu41, AcR13V* ввиду отсутствия у него аллелей, необходимых для формирования генотипа потомка (например, аллелей 163 и 167 в локусе *An20*; 270 и 270 – в *As043*; 189 и 191 – в *Agu41*; 123 – в *AcR13V*). Самец 2781 также не подходит в качестве отца: он исключается по локусам *An20* (отсутствие 163), *As043* (отсутствие двух копий 270), *Ls19* (отсутствие 142), *Agu41* (отсутствие 189) и *AcR13V* (отсутствие 123). Другие исследованные самцы (2773, 2781) исключаются на основании несовместимости по нескольким локусам.

В качестве примера совместимости с самцом 2776 можно привести локус *As043:* самка передала аллели 250 и 274, а самец 2776 – два аллеля 270, что объясняет наличие у потомка аллелей 250, 270, 270, 274. В локусе *Ag10* самка передала аллели

258 и 283, а самец 2776 – аллели 250 и 266, что полностью соответствует генотипу потомка 250, 258, 266, 283. Аналогичные соотношения были подтверждены и для остальных локусов (*Agu38, Aru18, Ls19, Ag49a, Agu37, Ag18, Afu39* и др., табл. 20).

Таблица 20 – Подтверждение родства для потомка F_AB2784 по 12 микросателлитным локусам

Локус	**Самка (2774)**	**Самец (2776)**	**Потомок (2784)**	**От самки**	**От самца**
An20	155/159/159/167	155/159/163/167	155/159/163/167	**155/159**	**163/167**
Agu38	110/112/112/114	108/108/108/108	108/108/112/112	**112/112**	**108/108**
Aru18	137/137/137/139	137/137/137/139	137/137/137/137	**137/137**	**137/137**
As043	250/250/258/274	250/266/270/270	250/270/270/274	**250/274**	**270/270**
Ls19	138/138/142/142	135/138/142/142	135/138/142/142	**138/142**	**135/142**
Ag49a	192/196/202/204	202/202/202/204	192/202/204/204	**192/204**	**202/204**
Agu37	124/126/126/126	124/126/126/128	124/126/126/126	**124/126**	**126/126**
Agu41	191/191/193/201	189/191/191/201	189/191/191/191	**191/191**	**189/191**
AcR13V	123/127	123/123	123/123	**123**	**123**
Ag18	228/228/236/236	228/228/228/236	228/228/228/236	**228/236**	**228/228**
Ag10	250/258/275/283	250/250/254/266	250/258/266/283	**258/283**	**250/266**
Afu39	125/125/125/128	125/125/128/128	125/125/125/128	**125/128**	**125/125**

С целью повышения точности идентификации родительских пар и автоматизации процесса был дополнительно разработан и использован алгоритм, реализованный в виде программы для ЭВМ на языке программирования Python. Принцип алгоритма основан на учете формирования генотипа потомка как производной от генетического материала (гамет) родительской пары с учетом тетрасомного наследования. На первом этапе для каждой потенциальной родительской пары программа генерирует полный перечень теоретически возможных генотипов потомства. Для этого по каждому микросателлитному локусу из тетраплоидного генотипа каждого родителя формируются все возможные комбинации аллелей в гаметах (с учетом того, что гамета у тетраплоида несет два аллеля). Затем путем попарного комбинирования гамет самки и самца моделируется набор теоретически возможных генотипов потомства для каждого локуса (рис. 25).

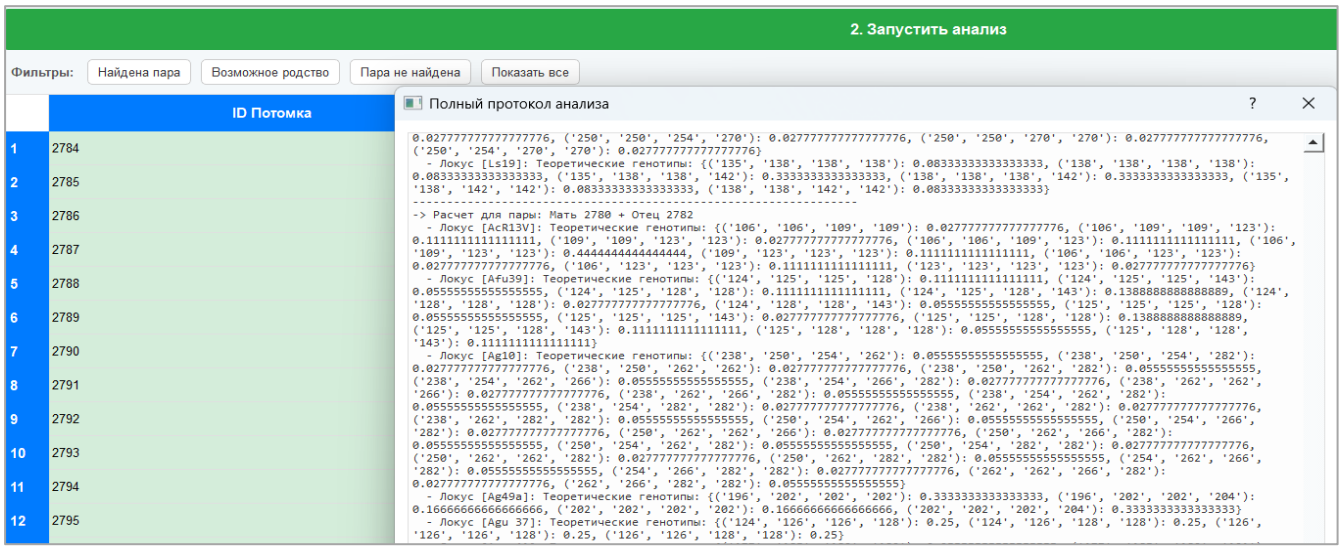


Рисунок 25. Расчет теоретических генотипов по каждому локусу, выполненный с помощью алгоритма

На втором этапе программа последовательно анализирует генотипы каждого реального потомка. Генотип особи-потомка по каждому локусу сравнивается с ранее смоделированным перечнем возможных генотипов для каждой родительской пары. Для каждой пары подсчитывается количество локусов, по которым генотип потомка совпал с теоретически ожидаемым. Результат анализа формируется на основе уровня совпадения (рис. 26):

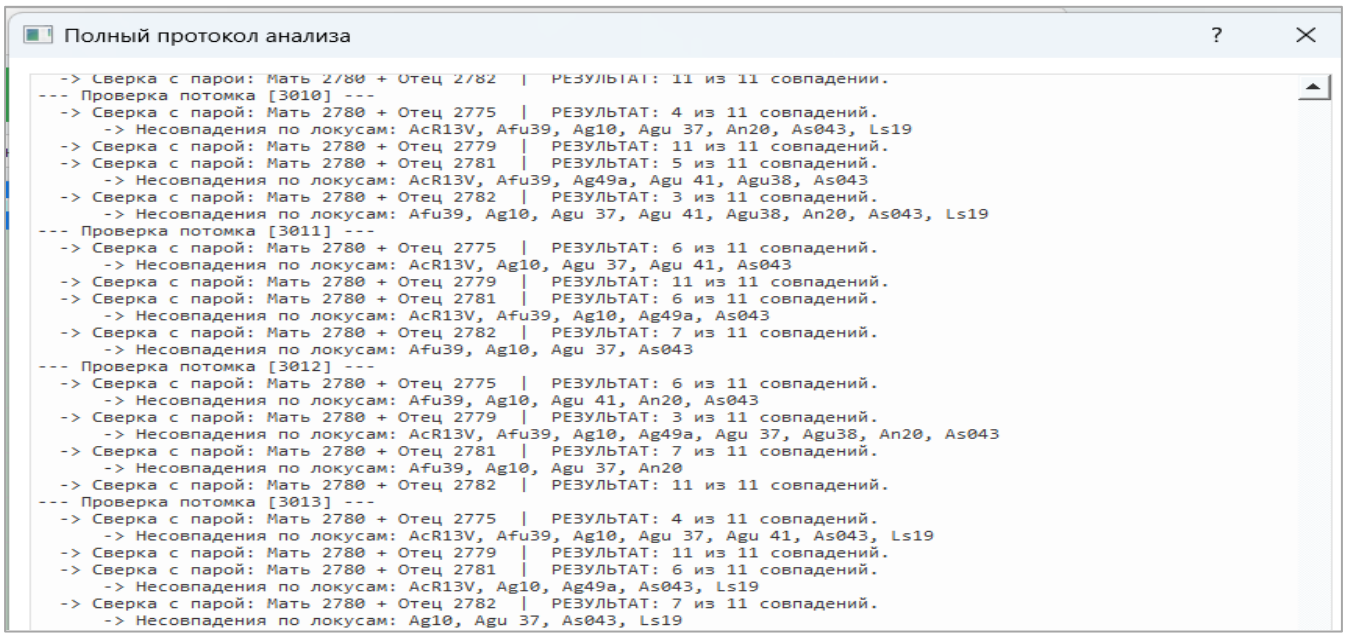


Рисунок 26. Поиск совпадения генотипов по каждому микросателлитному локусу

«Установленное родство» – присваивается, если генотип потомка на 100% соответствует теоретически возможному генотипу, смоделированному для одной родительской пары (то есть совпадение по всем 12 локусам);

«Вероятное родство» – присваивается в случае частичного совпадения генотипов (например, при совпадении по 11 из 12 локусов, что может быть следствием ошибки генотипирования).

Применение данной программы позволило полностью автоматизировать процесс идентификации родителей, исключить субъективные ошибки при визуальном сравнении генотипов и обрабатывать большие объемы данных. Верификация на экспериментальных семьях показала, что результаты, полученные с помощью Python - алгоритма, полностью совпадают с данными ручной проверки по таблицам совместимости, а время обработки сокращается в десятки раз.

3.5 Характеристика генетического разнообразия ремонтно-маточных стад сибирского осетра ленской популяции

В целях комплексной оценки состояния и дифференциации генетических ресурсов сибирского осетра ленской популяции заводского происхождения было проведено исследование пяти ремонтно-маточных стад (РМС), содержащихся в различных рыбоводных хозяйствах. Анализ базировался на изучении полиморфизма 12 микросателлитных локусов. Исследуемые группы были обозначены следующим образом: AB_Di, AB_MP, AB_Ud, AB_Aq, AB_Ma. Объем выборок варьировал от 18 до 55 особей. В таблице 21 представлены показатели аллельного разнообразия для пяти исследованных ремонтно-маточных стад сибирского осетра. Для каждой группы указаны объем выборки, среднее число аллелей на локус, число эффективных аллелей и аллельное разнообразие.

Таблица 21 – Показатели аллельного разнообразия в исследуемых группах сибирского осетра на основании полиморфизма 12-ти микросателлитных локусов

Группа	n	N_A±SEM	N_{AE}±SEM	A_R±SEM
AB_Di	55	6,417 ± 0,811	3,925 ± 0,576	6,006 ± 0,714
AB_MP	44	4,833 ± 0,601	3,038 ± 0,369	4,379 ± 0,443
AB_Ud	21	5,500 ± 0,691	3,658 ± 0,448	5,434 ± 0,675
AB_Aq	18	5,833 ± 0,683	3,748 ± 0,598	5,833 ± 0,683

Группа	n	N_A±SEM	N_{AE}±SEM	A_R±SEM
AB_Ma	39	5,833 ± 0,683	3,542 ± 0,496	5,514 ± 0,614

Примечание: N_A – среднее число аллелей на локус, N_{AE} – число эффективных аллелей на локус, A_R – аллельное разнообразие, SEM – ошибка среднего. AB_Di – ООО РТФ «Диана», AB_MP – МПЭРЗ, AB_Ud – Осетровое хозяйство в Удомле, AB_Aq – СППК "Аквaферма", AB_Ma – Мансуровское рыбоводное хозяйство.

Анализ полученных данных демонстрирует вариабельность генетической структуры между исследуемыми стадами. Наибольшее генетическое разнообразие сохранило стадо AB_Di, что подтверждается максимальными значениями среднего числа аллелей (N_A = 6,417 ± 0,811), эффективного числа аллелей (N_{AE} = 3,925 ± 0,576) и аллельного разнообразия (A_R = 6,006 ± 0,714). Высокие значения также отмечены для групп AB_Ud (N_A = 5,500 ± 0,691), AB_Aq (N_A = 5,833 ± 0,683) и AB_Ma (N_A = 5,833 ± 0,683).

Напротив, стадо AB_MP характеризуется наименьшим генетическим разнообразием: N_A = 4,833 ± 0,601, A_R = 4,379 ± 0,443. Снижение аллельного разнообразия в данной группе может быть следствием ориентации завода на выпуск молоди осетровых для восполнения природных популяций и как следствие, при формировании ремонтно-маточного стада предъявляются более строгие требования к происхождению производителей.

Для оценки степени гетерозиготности в каждом из исследуемых стад сибирского осетра были рассчитаны показатели наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, а также коэффициент инбридинга. Соответствующие данные представлены в таблице 22. Рассматривая полученные значения популяционно-генетических показателей, можно сказать, что анализируемые группы сибирского осетра не являются инбредными. Коэффициент инбридинга F_{IS} варьирует между хозяйствами от -0,048 в Можайском производственно-экспериментальном рыбоводном заводе (AB_MP) до 0,010 в Осетровом хозяйстве в Удомле (AB_Ud) и Мансуровском рыбоводном хозяйстве (AB_Ma).

Таблица 22 – Показатели степени гетерозиготности и коэффициенты инбридинга в исследуемых группах сибирского осетра на основании полиморфизма 12-ти микросателлитных локусов

Группа	n	H_E±SEM	H_O±SEM	H_O-H_E	F_{IS}±SEM
AB_Di	55	0,666 ± 0,054	0,674 ± 0,055	0,008	-0,019 ± 0,027
AB_MP	44	0,591 ± 0,066	0,639 ± 0,075	0,048	-0,048 ± 0,036
AB_Ud	21	0,679 ± 0,038	0,674 ± 0,046	-0,005	0,010 ± 0,036
AB_Aq	18	0,664 ± 0,049	0,665 ± 0,051	0,001	-0,005 ± 0,026
AB_Ma	39	0,652 ± 0,051	0,639 ± 0,052	-0,013	0,010 ± 0,042

Примечание: H_E – ожидаемая гетерозиготность, H_O – наблюдаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга, SEM – ошибка среднего. AB_Di – ООО РТФ «Диана», AB_MP – МПЭРЗ, AB_Ud – Осетровое хозяйство в Удомле, AB_Aq – СППК "Аквaферма", AB_Ma – Мансуровское рыбоводное хозяйство.

Для оценки информативности использованных маркеров был проведен анализ генетической изменчивости по каждому из 12 микросателлитных локусов для общей выборки сибирского осетра. Результаты представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Показатели генетического полиморфизма 12 микросателлитных локусов у сибирского осетра

Локусы	N_A±SEM	N_{AE}±SEM	A_R±SEM	H_E±SEM	H_O±SEM	F_{IS}±SEM
Agu38	4,400 ± 0,245	2,942 ± 0,247	4,300 ± 0,205	0,650 ± 0,030	0,683 ± 0,035	-0,053 ± 0,024
An20	8,800 ± 0,860	5,800 ± 0,947	8,230 ± 0,814	0,810 ± 0,028	0,838 ± 0,021	-0,036 ± 0,016
Aru18	3,800 ± 0,200	1,450 ± 0,091	3,726 ± 0,183	0,301 ± 0,038	0,317 ± 0,043	-0,052 ± 0,011
As043	10,200 ± 0,490	6,150 ± 0,845	9,388 ± 0,758	0,819 ± 0,034	0,851 ± 0,026	-0,043 ± 0,022
Ls19	4,400 ± 0,400	2,294 ± 0,209	4,128 ± 0,459	0,550 ± 0,038	0,583 ± 0,050	-0,057 ± 0,023
Ag49a	4,600 ± 0,400	2,388 ± 0,230	4,450 ± 0,291	0,566 ± 0,042	0,573 ± 0,046	-0,013 ± 0,021
Agu37	3,600 ± 0,245	2,368 ± 0,246	3,508 ± 0,218	0,557 ± 0,050	0,618 ± 0,06	-0,110 ± 0,023
Agu41	7,800 ± 0,583	4,624 ± 0,176	7,472 ± 0,568	0,782 ± 0,009	0,812 ± 0,013	-0,040 ± 0,025
AcR13V	3,200 ± 0,374	2,494 ± 0,476	3,192 ± 0,381	0,514 ± 0,119	0,392 ± 0,092	0,251 ± 0,042
Ag18	4,800 ± 0,374	3,814 ± 0,149	4,756 ± 0,350	0,736 ± 0,010	0,770 ± 0,027	-0,048 ± 0,038
Ag10	7,600 ± 0,400	4,704 ± 0,523	7,158 ± 0,337	0,778 ± 0,022	0,668 ± 0,055	0,149 ± 0,055
Afu39	5,000 ± 0,316	3,956 ± 0,297	4,892 ± 0,334	0,741 ± 0,020	0,794 ± 0,027	-0,073 ± 0,011

Примечание: N_A – среднее число аллелей на локус, N_{AE} – число эффективных аллелей на локус, A_R – аллельное разнообразие, H_O – наблюдаемая гетерозиготность, H_E – ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга, SEM – ошибка среднего.

Все исследуемые локусы оказались полиморфными. Наибольшим числом аллельных вариантов характеризуются локусы: *As043*(N_A=10,2 ± 0,490), *An20* (N_A= 8,8 ± 0,860) и *Agu41* (N_A= 7,8 ± 0,583), при этом микросателлитные локусы *AcR13V,*

Agu37, и *Aru18* показали относительно низкий полиморфизм (среднее количество аллелей на локус варьирует от 3,200 до 3,800 аллелей).

Детальный анализ распределения частот аллелей (табл. 24) выявил генетические различия между рассматриваемыми хозяйствами. Наиболее контрастные различия: по локусу *AcR13V* в стаде AB_MP наблюдается практически фиксированный аллель 127 п.н. (частота 0,966), тогда как в других хозяйствах присутствует со значительно более низкими частотами. Напротив, в стадах AB_Di и AB_Ud доминирует аллель 123 п.н. (частоты 0,396 и 0,631 соответственно).

Таблица 24 – Наиболее часто встречаемые аллели, по каждому локусу в исследованных рыбоводных хозяйствах

Группы / Локус	AB_Di	AB_MP	AB_Ud	AB_Aq	AB_Ma
Agu38	**108** (0,586)	**114** (0,347)	**108** (0,464)	**108** (0,639)	**110** (0,256) **112** (0,199)
An20	**157** (0,282) **164** (0,209)	**152** (0,233) **153** (0,403)	**164** (0,321)	**164** (0,181) **181** (0,111)	**157** (0,339)
AcR13V	**123** (0,396)	**127** (0,966)	**123** (0,631)	**127** (0,639)	**127** (0,359)
As043	**270** (0,191)	**262** (0,494)	**268** (0,238)	**262** (0,347)	**194** (0,122) **274** (0,212)
Ag49a	**202** (0,501)	**202** (0,494) **192** (0,341)	**202** (0,714)	**202** (0,528) **192** (0,347)	**202** (0,712)
Agu37	**126** (0,755)	**126** (0,659)	**128** (0,429)	**128** (0,514)	**128** (0,558)
Ls19	**139** (0,696)	**135** (0,608)	**141** (0,357)	**141** (0,444)	**139** (0,679)
Agu41	**189** (0,359)	**191**(0,364)	**201** (0,298)	**177** (0,389)	**189** (0,353)
Ag18	**228** (0,332)	**236** (0,335)	**236** (0,381)	**228** (0,361)	**228** (0,391) **236** (0,339)
Ag10	**262** (0,214)	**238** (0,227) **242** (0,210) **258** (0,233)	**250** (0,381)	**238** (0,375) **262** (0,361)	**254** (0,333)
Afu39	**125** (0,377)	**125** (0,273) **128** (0,273)	**125** (0,393)	**128** (0,306)	**128** (0,455)
Aru18	**137** (0,832)	**137** (0,858)	**137** (0,702)	**137** (0,861)	**137** (0,865)

Примечание: Жирным шрифтом отмечены номера аллелей; в скобках указана частота встречаемости аллелей. AB_Di – ООО РТФ «Диана», AB_MP – МПЭРЗ, AB_Ud – Осетровое хозяйство в Удомле, AB_Aq – Сельскохозяйственный потребительский перерабатывающий кооператив "Аквaферма", AB_Ma – Мансуровское рыбоводное хозяйство.

Локус *Ls19* также демонстрирует выраженную межпопуляционную изменчивость: в стадах AB_Di и AB_Ma преобладает аллель 139 п.н. (0,696 и 0,679), в то время как для стад AB_Ud и AB_Aq характерна высокая частота аллеля 141 п.н. (0,357 и 0,444 соответственно), указывающая на их потенциальную генетическую близость по данному маркеру.

Локус *An20* позволяет идентифицировать стадо AB_MP, для которого характерны высокие частоты аллелей 152 п.н. (0,233) и 153 п.н. (0,392) при крайне низкой частоте аллеля 157 п.н. (0,011). В свою очередь, в стаде AB_Ma аллель 157 п.н. является одним из доминирующих (0,339). Редкий аллель 181 п.н. встречается с заметной частотой только в хозяйстве AB_Aq (0,111).

Локус *As043* показывает резкие различия в распределении аллеля 262 п.н.: его частота максимальна в AB_MP (0,494), минимальна в AB_Di (0,032). Также высокая частота аллеля 274 п.н. наблюдается в стаде AB_Ma (0,212) по сравнению с другими группами.

Среднее значение генетических дистанций F_{ST} между всеми исследованными группами сибирского осетра составило 0,0973. Для визуализации генетической дифференциации между исследуемыми группами был применен метод главных координат (PCoA) (рис. 27).

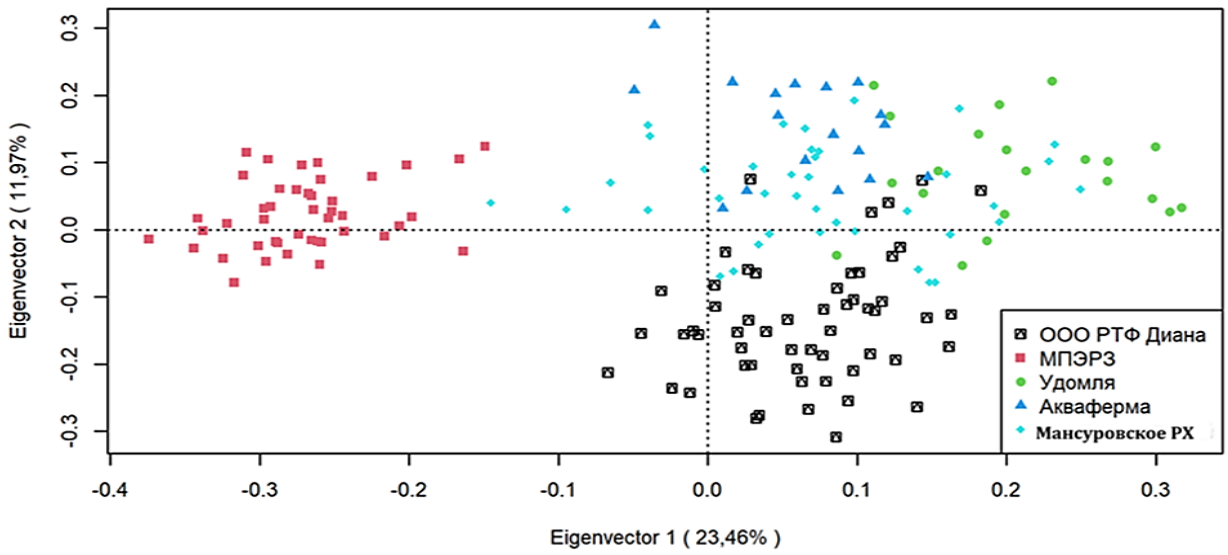
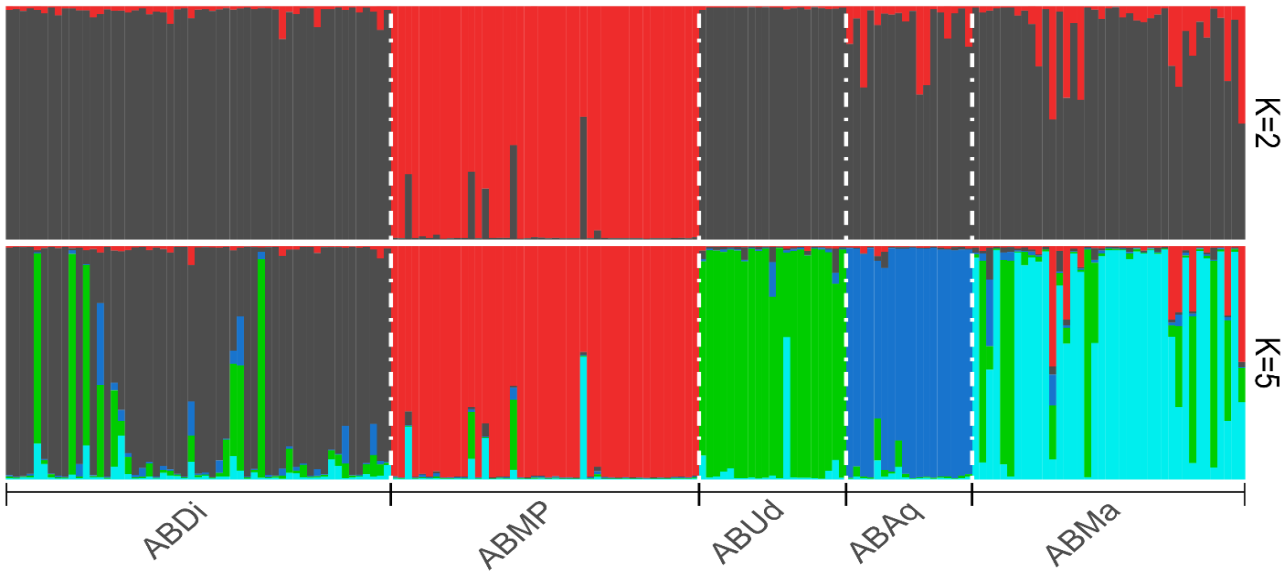


Рисунок 27. Локализация особей сибирского осетра из 5-ти рыбоводных предприятий в пространстве двух измерений на основании генотипов по 12-ти микросателлитным локусам

Анализ главных координат (PCoA) показывает дифференциацию аквакультурных стад на два основных кластера. Первый кластер образован особями группы AB_MP (Можайский производственно-экспериментальный рыбоводный завод), которые обособляются от всех остальных хозяйств на значительное генетическое расстояние. Такая выраженная генетическая изоляция может указывать на отсутствие пополнения маточного стада AB_MP производителями извне на протяжении значительного времени. Второй кластер объединяет остальные четыре хозяйства. Внутри этого кластера наблюдается генетическая близость между группами AB_Ud (Осетровое хозяйство в Удомле) и AB_Ma (Мансуровское рыбоводное хозяйство), что согласуется с наименьшим значением генетической дистанции между ними (0,0507).

Дополнительно был выполнен расчет формирования генетических кластеров на основании коэффициента подобия *Q* (анализ выполнен в программе STRUCTURE) (рис. 28).



Примечание: по оси *X* представлены особи исследованных групп: AB_Di – ООО РТФ «Диана», AB_MP – МПЭРЗ, AB_Ud – Осетровое хозяйство в Удомле, AB_Aq – Сельскохозяйственный потребительский перерабатывающий кооператив "Акваферма", AB_Ma – Мансуровское рыбоводное хозяйство; по оси *Y* – коэффициент подобия *Q, %.*

Рисунок 28. Кластерный анализ особей сибирского осетра 5-ти рыбоводных хозяйств, выполненный в программе *STRUCTURE*

Оптимальное число генетических кластеров (K) определяли на основе оценки логарифма правдоподобия (ΔK). В соответствии с полученными данными, максимальная дифференциация выборки наблюдается при $K = 2$, что указывает на разделение исследуемых групп на два основных генетических кластера

Для детализации генетической структуры исследуемых групп был также проведен анализ при $K = 5$, позволяющий оценить степень генетической однородности внутри каждого хозяйства. Наибольшая генетическая однородность характерна для группы AB_MP, особи которой практически полностью ассоциированы с одним кластером. Для остальных (AB_Di, AB_Ud, AB_Aq, AB_Ma) выявлен смешанный генетический состав. Полученные данные согласуются с результатами метода главных координат (PCoA), подтверждая наличие выраженной генетической изоляции стада AB_MP.

Проведенный анализ позволил выявить особенности в уровне генетического разнообразия и структуре пяти исследованных ремонтно-маточных стад сибирского осетра ленского происхождения. Наибольшим генетическим разнообразием характеризуется стадо AB_Di, что делает его ценным генетическим ресурсом для селекционной работы.

Выявленная дифференциация генетической структуры аквакультурных стад сибирского осетра, происходящих из разных предприятий, отражает влияние проводимой в хозяйствах селекционно-племенной работы. Наличие генетически дифференцированных стад может в дальнейшем быть полезно при формировании новых пород и линий сибирского осетра. С другой стороны, перед выпуском молоди сибирского осетра в естественные популяции целесообразно проводить сравнение генетических профилей диких и выпускаемых рыб с целью контроля и сохранения особенностей нативных популяций.

3.5.1 Влияние индивидуальной гетерозиготности на показатели роста ленского осетра

Поскольку стада сибирского осетра в заводских условиях происходят от ограниченного числа родительских особей, существует вероятность проявления

инбредной депрессии. Это может негативно сказаться на продуктивных качествах потомства. Для проверки данного предположения был проведен анализ связи между индивидуальной гетерозиготностью, рассчитанной по 12 микросателлитным локусам и продуктивными показателями: среднесуточный прирост (г/сут) и удельная скорость роста SGR (%/сут). На протяжении всего эксперимента рыба содержалась в идентичных условиях (температурный режим, кормление, гидрохимические показатели) в установке замкнутого водоснабжения (УЗВ).

Общая исследуемая выборка сибирского осетра (203 особи) была разделена на три группы на основе распределения гетерозиготности:

группа 1 (низкая гетерозиготность) – значения 0,5 – 0,60;

группа 2 (средняя гетерозиготность) – значения 0,61 – 0,74;

группа 3 (высокая гетерозиготность) – значения 0,75 – 0,88.

Численность групп составила: 23, 119 и 61 особь соответственно. В таблице 25 представлены статистические показатели по каждой группе.

Таблица 25 – Показатели роста в группах с разным уровнем гетерозиготности

Группа	Уровень гетерозиготности	n	Среднесуточный прирост, г/сут	SGR (%/сут)
1	Низкий (0,5 – 0,60)	23	2,43 ± 0,91	0,472 ± 0,159
2	Средний (0,61– 0,74)	119	2,31 ± 1,03	0,472 ± 0,180
3	Высокий (0,75 – 0,88)	61	2,36 ± 0,97	0,445 ± 0,172

Примечание: продолжительность эксперимента (период измерений) составила 64 суток (17.01.2023 – 21.03.2023).

Согласно представленным данным, средние значения среднесуточного прироста в трех группах различаются незначительно: 0,231 – 2,43 г/сут. Наибольшее среднее значение отмечено в группе с низкой гетерозиготностью (группа 1), наименьшее – в группе со средней гетерозиготностью (группа 2). Средние значения удельной скорости роста SGR практически одинаковы в группах 1 и 2 (0,472%/сут) и несколько ниже в группе 3 (0,445%/сут).

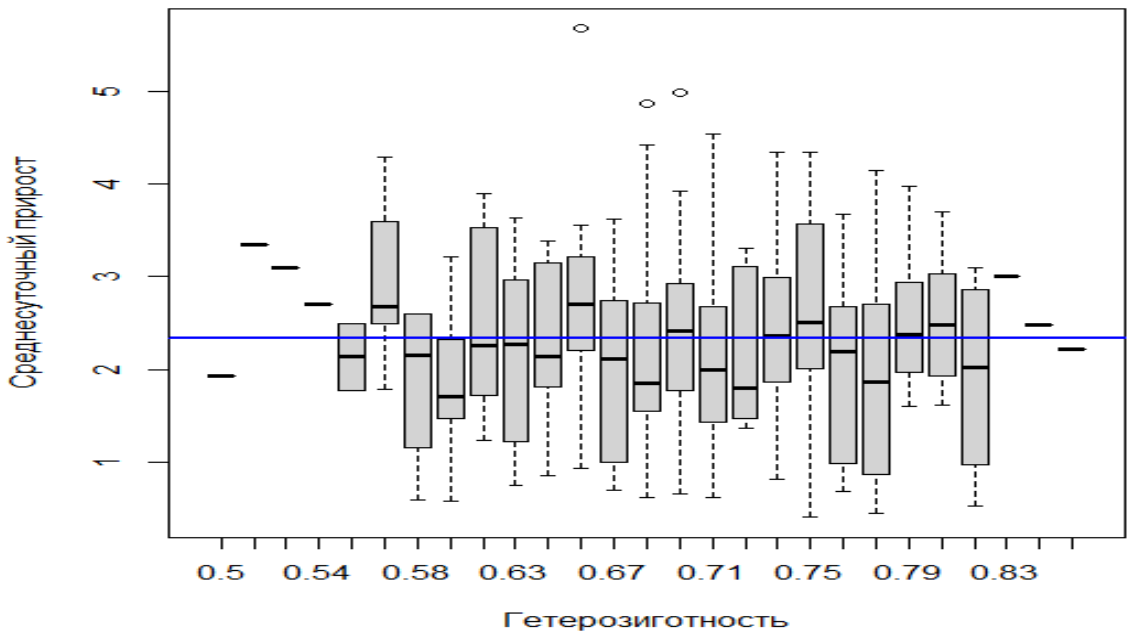
Для оценки статистической значимости различий между группами был использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Результаты дисперсионного анализа приведены в таблице 26.

Таблица 26 – Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA)

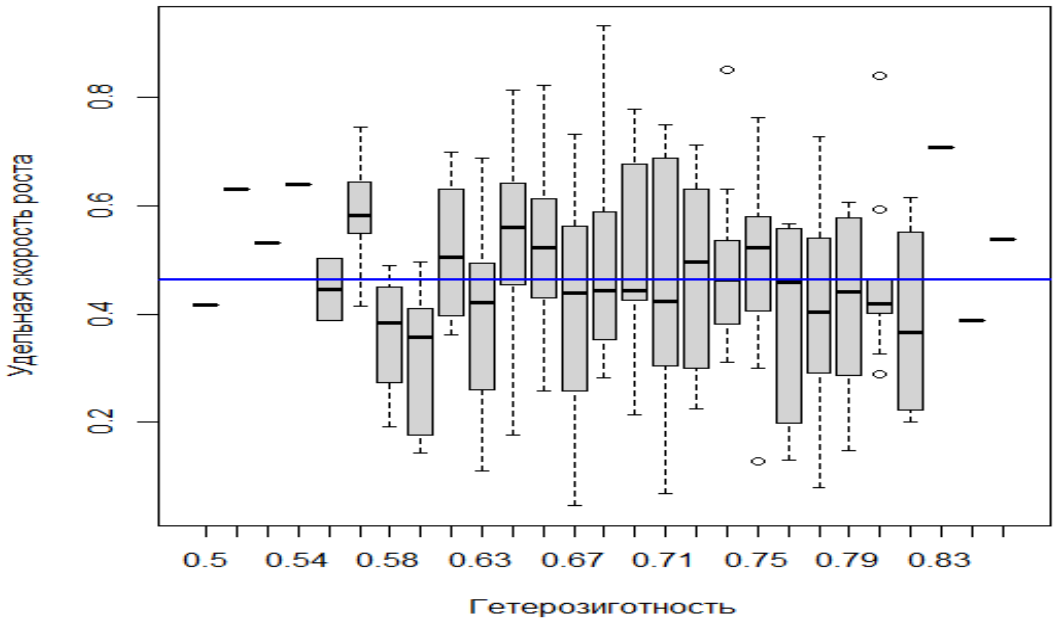
Показатель	*F*	*p*
Среднесуточный прирост, г/сут	0,15	0,8579
Удельная скорость роста SGR %/сут	0,49	0,6128

Дополнительно был проведен корреляционный анализ Пирсона. Корреляционный анализ также не выявил значимой связи между уровнем гетерозиготности и показателями роста: коэффициент корреляции Пирсона для среднесуточного прироста составил $r = -0{,}015$ ($p > 0{,}05$), для удельной скорости роста – $r = -0{,}068$ ($p > 0{,}05$). В то же время, как и следовало ожидать, между двумя показателями роста обнаружена высокая положительная корреляция ($r = 0{,}80$; $p < 0{,}001$). На рисунке 29 (А) представлено распределение среднесуточного прироста в группах с разным уровнем гетерозиготности, на рисунке 29 (Б) – распределение удельной скорости роста.

А)



Б)



Примечание: на диаграмме отображены средние значения с ошибкой (M ± m).

Рисунок 29. Зависимость среднесуточного прироста (А) и удельной скорости роста (Б) от индивидуальной гетерозиготности у сибирского осетра

Полученные данные согласуются с исследованием (Borrell Y. et al., 2004), которые также не обнаружили значимой связи между гетерозиготностью по микросателлитным локусам и ростовыми показателями (длиной и массой) у алтантического лосося *(Salmo salar).* В то же время авторами была выявлена положительная корреляция между гетерозиготностью по аллозимным локусам и показателями роста. Аналогичные результаты были получены (Pogson G. H., Fevolden S. E., 1998), которые не выявили значимой связи между гетерозиготностью и скоростью роста у атлантической трески *(Gadus morhua)* из популяции Баренцева моря, однако отметили положительную корреляцию в стрессовых условиях.

Таким образом, в настоящем исследовании не выявлено статистически значимой связи между индивидуальной гетерозиготностью и среднесуточным приростом (F = 0,15; p = 0,858), а также между гетерозиготностью и удельной скоростью роста SGR (F = 0,49; p = 0,613). Полученные данные свидетельствуют о

том, что индивидуальная гетерозиготность не является определяющим фактором продуктивных признаков у особей сибирского осетра, выращиваемых в индустриальных условиях.

Отсутствие корреляции может быть связано с тем, что показатели роста в большей степени определяются генами, непосредственно контролирующих соматический рост, в частности генов соматотропной оси (гормон роста GH, его рецептор GHR, инсулиноподобные факторы роста *IGF1*, *IGF2*), а также регуляторными механизмами, влияющими на их экспрессию (Писаренко Н. Б. и др., 2024).

3.6 Генетическая дифференциация аквакультурных групп сибирского осетра различного географического происхождения

Для оценки влияния исходного географического происхождения на формирование генетической структуры в условиях аквакультуры был проведен сравнительный анализ полиморфизма микросателлитных локусов у представителей аквакультурных групп сибирского осетра, происходящих из ленской (AB_LEN), обской (AB_OB) и енисейской (AB_EN) популяций. Основные характеристики генетического разнообразия исследуемых групп представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Характеристика полиморфизма аквакультурных групп сибирского осетра различного происхождения

Группа	n	N_A±SEM	N_{AE}±SEM	A_R±SEM
AB_LEN	177	8,000 ± 0,924	4,575 ± 0,643	5,453 ± 0,537
AB_EN	33	6,818 ± 1,242	4,124 ± 0,784	5,467 ± 0,683
AB_OB	13	7,909 ± 1,202	5,185 ± 1,084	6,006 ± 0,843

Примечание: N_A – среднее число аллелей на локус, N_{AE} – число эффективных аллелей на локус, A_R – аллельное разнообразие, SEM – ошибка среднего. AB_LEN – сибирский осетр ленского происхождения, AB_EN – сибирский осетр енисейского происхождения, AB_OB – сибирский осетр обского происхождения.

Анализ генетического разнообразия показал следующие результаты: наибольшие показатели среднего числа аллелей зафиксированы у группы ленского происхождения (N_A = 8,000 ± 0,924), при этом стадо сибирского осетра обского происхождения (AB_Ob) продемонстрировало максимальные значения

эффективного числа аллелей (N_{AE} = 5,185 ± 1,084) и аллельного разнообразия (A_R = 6,006 ± 0,843) среди всех исследованных групп. Енисейская группа (AB_EN) характеризовалась наименьшими значениями: N_A = 6,818 ± 1,242 и A_R (5,467 ± 0,683).

По данным таблицы 28 анализ коэффициента инбридинга (F_{IS}) показал, что для группы AB_OB характерно наблюдаемое и ожидаемое равновесие гетерозигот (F_{IS} = 0,002). В группе AB_LEN характерен небольшой дефицит гетерозигот F_{IS} = 0,032, а в группе AB_EN – более выраженный дефицит (F_{IS} = 0,067), что указывает на наличие умеренного инбридинга в данных группах.

Таблица 28 – Наблюдаемая и ожидаемая степени гетерозиготности для исследуемых групп

Группа	n	H_E±SEM	H_O±SEM	H_O-H_E	F_{IS}±SEM
AB_LEN	177	0,725 ± 0,042	0,700 ± 0,039	-0,025	0,032 ± 0,031
AB_EN	33	0,737 ± 0,033	0,689 ± 0,044	-0,048	0,067 ± 0,042
AB_OB	13	0,710 ± 0,047	0,714 ± 0,069	0,004	0,002 ± 0,065

Примечание: H_O – наблюдаемая гетерозиготность, H_E – ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга, SEM – ошибка среднего. AB_LEN – сибирский осетр ленского происхождения, AB_EN – сибирский осетр енисейского происхождения, AB_OB – сибирский осетр обского происхождения.

Для оценки уровня генетической дифференциации между группами были рассчитаны генетические дистанции F_{ST} (табл. 29). Полученные значения варьировали от 0,0638 до 0,0946, что соответствует умеренному уровню генетической дифференциации. Максимальные генетические различия зафиксированы между группами обского и енисейского происхождения (F_{ST} = 0,0946), тогда как минимальные – между ленской и обской группами (F_{ST} = 0,0638).

Таблица 29 – Генетические дистанции F_{ST} между группами сибирского осетра различного происхождения

Группы	AB_LEN	AB_EN	AB_OB
AB_LEN		0,0815	0,0638
AB_EN	0,0815		0,0946
AB_OB	0,0638	0,0946	

Примечание: AB_LEN – сибирский осетр ленского происхождения, AB_EN – сибирский осетр енисейского происхождения, AB_OB – сибирский осетр обского происхождения.

Важно отметить, что помимо дифференциации между группами разного географического происхождения, существенные генетические различия выявляются и между группами одного происхождения. В частности, при сравнении двух доместицированных групп ленского сибирского осетра – AB_MP и AB_Di – величина генетической дистанции составила 0,1290.

Данный результат свидетельствует о том, что внутривидовая генетическая дифференциация в аквакультуре сибирского осетра в значительной степени определяется не столько исходным географическим происхождением (Лена, Енисей, Обь), сколько особенностями формирования ремонтно-маточных стад конкретного рыбоводного хозяйства. Эффект основателя, когда стадо создается из ограниченного числа производителей, и последующая селекционная работа без генетического мониторинга приводят к формированию уникальных генетических профилей, которые могут сильнее отличаться друг от друга, чем профили рыб из разных рек.

Сравнение доместицированных осетров разного происхождения подтвердило высокий генетический потенциал исследуемых групп. Однако, учитывая, что выборка для каждой группы (обская, енисейская) была ограничена одним хозяйством, для формирования достоверной оценки генетического состояния аквакультурных стад в целом необходимо расширение выборки.

Для долгосрочного сохранения генетических ресурсов необходима организация системы регулярного генетического мониторинга ремонтно-маточных стад. Также, в целях минимизации эффекта инбридинга и поддержания генетического разнообразия целесообразно наладить контролируемый обмен племенным материалом между рыбоводными хозяйствами.

3.7 Сравнительный анализ генетического полиморфизма сибирского осетра с другими представителями семейства Acipenseridae

Для оценки уровня генетического разнообразия и степени дифференциации видов осетровых выполнен анализ полиморфизма 12 микросателлитных локусов у девяти групп Acipenseridae. В таблице 30 представлены показатели аллельного

разнообразия для пяти тетраплоидных видов осетровых: сибирского осетра (ABAE), амурского осетра (ASCH), русского осетра (AGUE), сахалинского осетра (AMIK) и калуги (HDAU).

Таблица 30 – Показатели аллельного разнообразия тетраплоидных видов осетровых на основании анализа 12-ти микросателлитных локусов

Виды (4n)	n	N_A±SEM	N_{AE}±SEM	A_R±SEM
ABAE	177	7,667 ± 0,907	4,312 ± 0,643	4,489 ± 0,41
ASCH	24	10,167 ± 1,375	5,679 ± 1,048	5,438 ± 0,521
AGUE	39	11,000 ± 1,291	5,106 ± 0,857	5,071 ± 0,517
AMIK	10	3,250 ± 0,552	2,289 ± 0,346	2,716 ± 0,418
HDAU	10	6,750 ± 0,827	4,198 ± 0,847	4,566 ± 0,476

Примечание: N_A – среднее число аллелей на локус; N_{AE} – число эффективных аллелей на локус, A_R – аллельное разнообразие, SEM – ошибка среднего. ABAE – сибирский осетр ленского происхождения (общая выборка), ASCH – амурский осетр, AGUE – русский осетр, AMIK – сахалинский осетр, HDAU – калуга.

В таблице 31 приведены показатели наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, а также коэффициенты инбридинга для тетраплоидных представителей.

Таблица 31 – Показатели гетерозиготности и коэффициенты инбридинга тетраплоидных видов осетровых по 12-ти микросателлитным локусам

Виды (4n)	n	H_E±SEM	H_O±SEM	H_O - H_E	F_{IS}±SEM
ABAE	177	0,700 ± 0,047	0,657 ± 0,052	-0,043	0,059 ± 0,039
ASCH	24	0,730 ± 0,066	0,685 ± 0,067	-0,045	0,053 ± 0,042
AGUE	39	0,713 ± 0,060	0,677 ± 0,064	-0,036	0,051 ± 0,034
AMIK	10	0,407 ± 0,098	0,400 ± 0,103	-0,007	0,061 ± 0,079
HDAU	10	0,664 ± 0,060	0,517 ± 0,063	-0,147	0,221 ± 0,059

Примечание: H_O – наблюдаемая гетерозиготность, H_E – ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга, SEM – ошибка среднего. ABAE – сибирский осетр ленского происхождения (общая выборка), ASCH – амурский осетр, AGUE – русский осетр, AMIK – сахалинский осетр, HDAU – калуга.

Максимальные показатели разнообразия отмечены для русского (AGUE) и амурского (ASCH) осетров: N_A = 11,000 ± 1,291 и 10,167 ± 1,375, N_{AE} = 5,106 ± 0,857 и 5,679 ± 1,048 соответственно. Сибирский осетр (ABAE) характеризуется умеренным уровнем разнообразия: N_A = 7,667 ± 0,907; H_E = 0,700 ± 0,047. Калуга (HDAU) имеет средние показатели аллельного разнообразия: N_A = 6,750 ± 0,827; H_E

= 0,664 ± 0,060 и высокий коэффициент инбридинга F_{IS} = 0,221 ± 0,059, что указывает на ограниченную численность группы и близкородственные скрещивания. Наименьшее разнообразие среди тетраплоидов зафиксировано для сахалинского осетра (AMIK): H_E = 0,407 ± 0,098; N_A = 3,250 ± 0,552; низкий полиморфизм и фиксированное состояние ряда локусов, вероятно, связано с эффектом основателя при формировании немногочисленной выборки.

В таблице 32 представлены показатели аллельного разнообразия для диплоидных представителей осетровых: белуги (HUS), севрюги (ASTEL), шипа (ANUD) и стерляди (ARUT).

Таблица 32 – Показатели аллельного разнообразия диплоидных видов осетровых по 12-ти микросателлитных локусам

Виды (2n)	n	N_A±SEM	N_{AE}±SEM	A_R±SEM
HUS	22	3,583 ± 0,336	2,199 ± 0,221	2,606 ± 0,236
ASTEL	68	4,917 ± 1,062	2,837 ± 0,674	3,193 ± 0,533
ANUD	6	4,083 ± 0,484	2,880 ± 0,481	3,901 ± 0,431
ARUT	48	5,500 ± 0,989	3,320 ± 0,753	3,494 ± 0,528

Примечание: N_A – среднее число аллелей на локус. N_{AE} – число эффективных аллелей на локус; A_R – аллельное разнообразие, SEM – ошибка среднего. HUS – белуга, ASTEL – севрюга, ANUD – шип, ARUT – стерлядь.

В таблице 33 приведены соответствующие показатели гетерозиготности и коэффициенты инбридинга для диплоидных представителей.

Таблица 33 – Показатели гетерозиготности и коэффициенты инбридинга диплоидных видов осетровых по 12-ти микросателлитных локусам

Виды (2n)	n	H_E±SEM	H_O±SEM	H_O - H_E	F_{IS}±SEM
HUS	22	0,471 ± 0,070	0,515 ± 0,112	0,044	-0,053 ± 0,147
ASTEL	68	0,505 ± 0,083	0,413 ± 0,079	-0,092	0,125 ± 0,096
ANUD	6	0,544 ± 0,072	0,495 ± 0,102	-0,049	0,093 ± 0,105
ARUT	48	0,550 ± 0,074	0,462 ± 0,081	-0,088	0,135 ± 0,085

Примечание: H_O – наблюдаемая гетерозиготность. H_E – ожидаемая гетерозиготность, F_{IS} – коэффициент инбридинга, SEM – ошибка среднего. HUS – белуга, ASTEL – севрюга, ANUD – шип, ARUT – стерлядь.

Наибольшие показатели среди диплоидной группы отмечены у стерляди (ARUT) и севрюги (ASTEL): N_A = 5,500 ± 0,989 и 4,917 ± 1,062, H_E = 0,550 ± 0,074 и 0,505 ± 0,083 соответственно. Севрюга выделяется наличием специфичного аллеля в локусе *Afu39* (116 п.н.). Шип (ANUD) демонстрирует следующие

показатели: N_A = 4,083 ± 0,484; H_E = 0,544 ± 0,072. Наименьший уровень генетического разнообразия зафиксирован у белуги: N_A = 3,583 ± 0,336; H_E = 0,471 ± 0,019, по большинству локусов количество аллелей не превышало 5 – 6.

Для количественной оценки степени генетической обособленности между исследованными видами осетровых рыб рассчитаны попарные дистанции F_{ST} (табл. 34).

Таблица 34 – Матрица попарных генетических дистанций F_{ST} между исследованными видами осетровых рыб

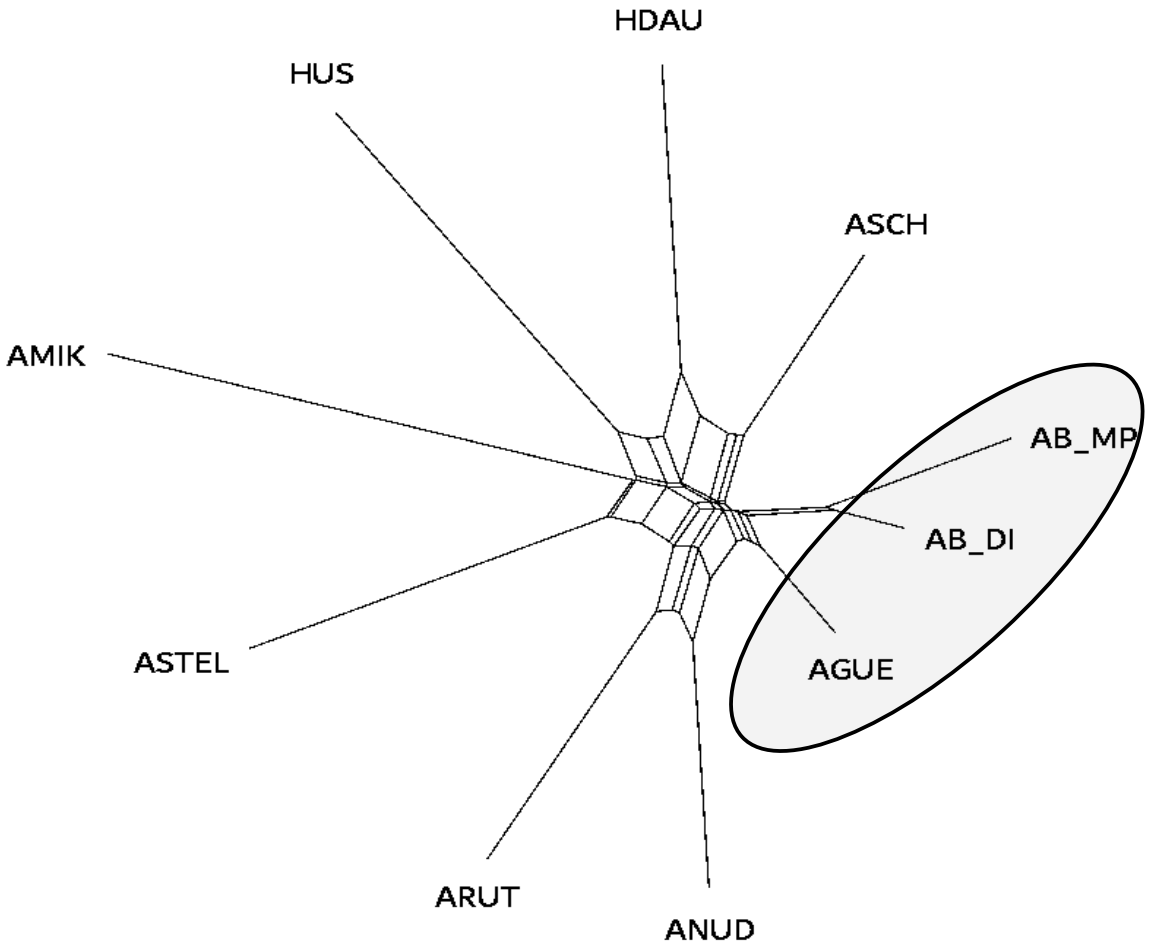
Виды	AB_Di	AB_MP	ASCH	AGUE	AMIK	HDAU	HUS	ASTEL	ANUD	ARUT
AB_Di		0,129	0,225	0,144	0,392	0,318	0,361	0,329	0,284	0,268
AB_MP	0,129		0,288	0,206	0,437	0,385	0,409	0,378	0,342	0,323
ASCH	0,225	0,288		0,210	0,433	0,302	0,409	0,387	0,317	0,377
AGUE	0,144	0,206	0,210		0,353	0,314	0,346	0,340	0,240	0,324
AMIK	0,392	0,437	0,433	0,353		0,492	0,480	0,448	0,493	0,483
HDAU	0,318	0,385	0,302	0,314	0,492		0,409	0,424	0,410	0,435
HUS	0,361	0,409	0,409	0,346	0,480	0,409		0,429	0,472	0,460
ASTEL	0,329	0,378	0,387	0,340	0,448	0,424	0,429		0,391	0,390
ANUD	0,284	0,342	0,317	0,240	0,493	0,410	0,472	0,391		0,291
ARUT	0,268	0,323	0,377	0,324	0,483	0,435	0,460	0,390	0,291	

Примечание: AB_Di – сибирский осетр ленского происхождения ООО РТФ «Диана», AB_MP – сибирский осетр ленского происхождения МПЭРЗ, ASCH – амурский осетр, AGUE – русский осетр, AMIK – сахалинский осетр, HDAU – калуга, HUS – белуга, ASTEL – севрюга, ANUD – шип, ARUT – стерлядь.

Наибольшая дифференциация наблюдается между сахалинским осетром (AMIK) и всеми остальными видами (F_{ST} = 0,433 – 0,493). Максимальные значения зафиксированы в парах AMIK – ANUD (0,493), а также AMIK – HUS (белуга) (0,480). Высокие значения F_{ST} с участием сахалинского осетра объясняются его принадлежностью к тихоокеанской филогенетической кладе, тогда как шип, белуга относятся к атлантической кладе. Минимальные дистанции отмечены между группами сибирского осетра (AB_Di и AB_MP, F_{ST} = 0,129) и между сибирским и русским (AGUE) осетрами (F_{ST} = 0,144), что свидетельствует об их филогенетическом родстве в пределах атлантической клады.

На основе попарных значений F_{ST} построена дендрограмма (рис. 30). На дендрограмме сибирский осетр ленского происхождения (AB_Di, AB_MP) и

русский осетр (AGUE) объединяются в общий кластер, что указывает на их относительно более высокое генетическое сходство по сравнению с другими видами. Остальные виды формируют самостоятельные ветви, однако степень их обособленности варьирует.

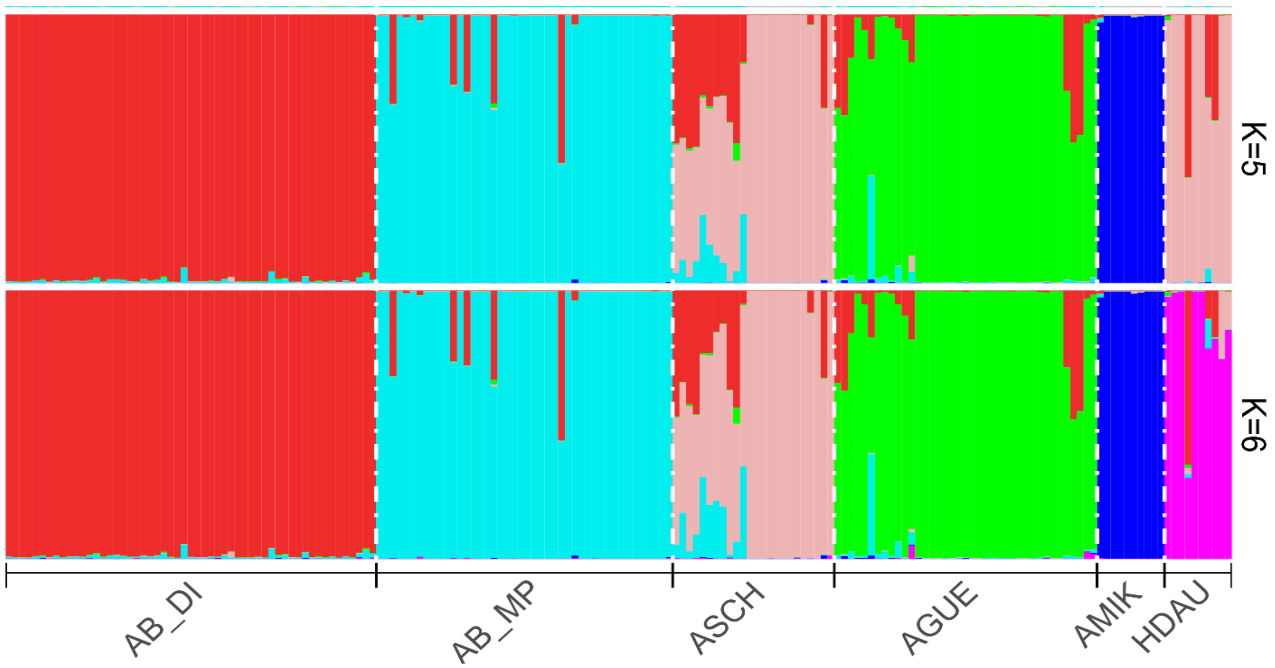


Примечание: AB_Di – сибирский осетр ленского происхождения ООО РТФ «Диана», AB_MP – сибирский осетр ленского происхождения МПЭРЗ, ASCH – амурский осетр, AGUE – русский осетр, AMIK – сахалинский осетр, HDAU – калуга, HUS – белуга, ASTEL – севрюга, ANUD – шип, ARUT – стерлядь.

Рисунок 30. Дендрограмма генетического сходства осетровых рыб, построенная на основе попарных значений F_{ST}

Для верификации кластеров выполнен байесовский анализ в программе STRUCTURE: отдельно для тетраплоидных (4n) (рис. 31) и диплоидных (2n) видов. При K = 5 наблюдается объединение амурского осетра и калуги в один общий

кластер. Увеличение числа предполагаемых кластеров до $K = 6$ позволило достичь более четкой дифференциации всех видов. Важно отметить, что особи сибирского осетра, происходящие из двух различных рыбоводных хозяйств, также распределились по двум разным кластерам. Это указывает на наличие внутривидовой генетической дифференциации, сформировавшейся в условиях аквакультуры вследствие эффекта основателя и длительного независимого разведения, что согласуется с данными, полученными при анализе ремонтно-маточных стад.



Примечание: по оси *X* представлены особи исследованных видов по оси *Y* – коэффициент подобия Q, %. Для числа кластеров при $K = 5$, $K = 6$. AB_Di – сибирский осетр ленского происхождения ООО РТФ «Диана», AB_MP – сибирский осетр ленского происхождения МПЭРЗ, ASCH – амурский осетр, AGUE – русский осетр, AMIK – сахалинский осетр, HDAU – калуга.

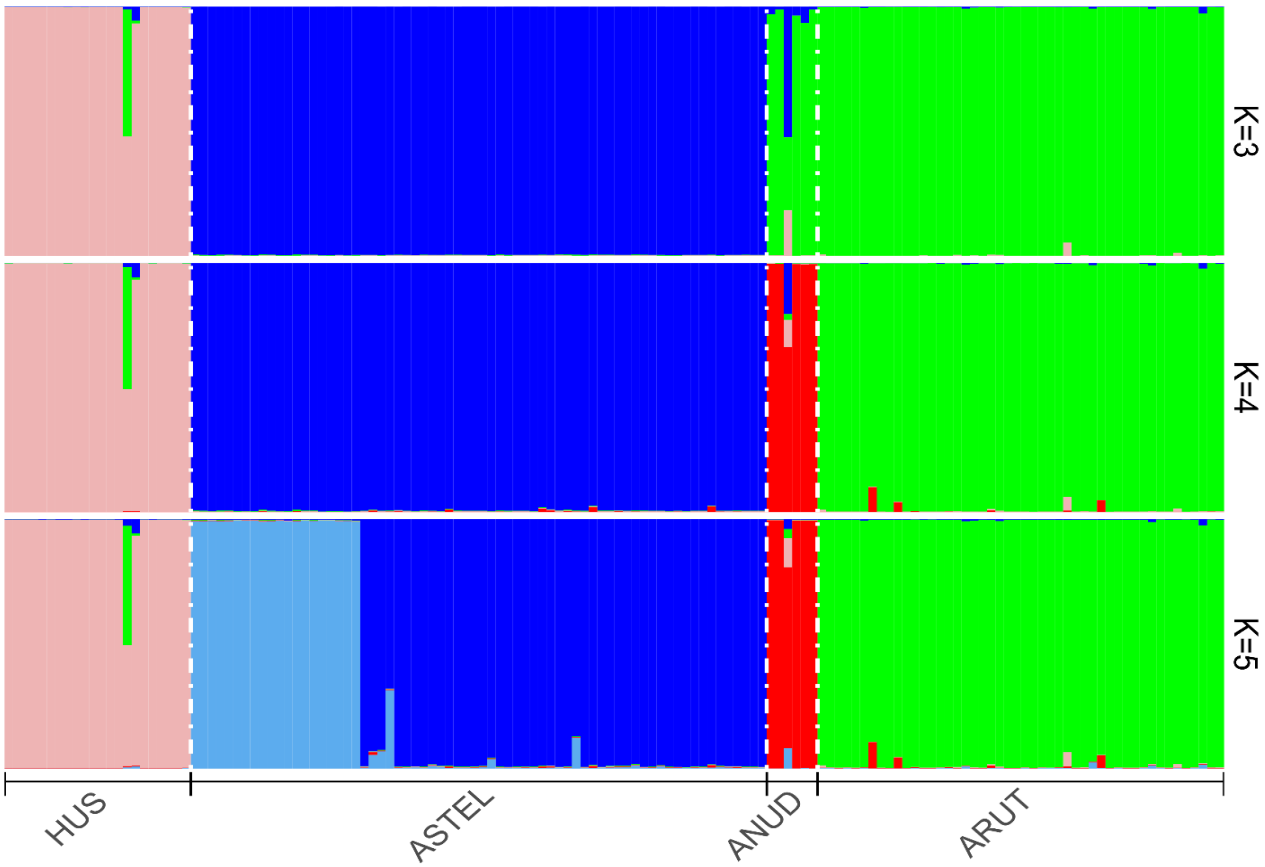
Рисунок 31. Кластерный анализ тетраплоидных представителей осетровых рыб, выполненный на основании частот аллелей 12-ти микросателлитных локусов в программе *STRUCTURE*

Сахалинский осетр (AMIK) формирует наиболее обособленный и генетически однородный кластер. Русский осетр (AGUE) образует отдельный кластер, генетически близкий, но отличимый от сибирского осетра. В выборке амурского осетра (ASCH) были выявлены особи с смешанным происхождением. У

нескольких экземпляров наблюдается снижение доли генотипа, характерного для амурского осетра, и появление вклада от кластера, ассоциированного с сибирским осетром.

Для особей, относящихся к чистым видам, характерны значения коэффициента подобия *Q* превышающие 0,995. У гибридных особей доля кластера, соответствующего амурскому осетру снижена до 0,439 – 0,677, тогда как суммарная доля сибирских кластеров составляет 0,319 – 0,549. Полученные результаты демонстрируют наличие гибридных особей в исследованной выборке амурского осетра, предположительно имеющих происхождение от скрещивания с сибирским осетром.

Кластерный анализ для диплоидных видов представлен на рисунке 32.



Примечание: по оси X представлены особи исследованных видов по оси У – коэффициент подобия Q, % для числа кластеров при K = 3; K = 4; K = 5.

HUS – белуга, ASTEL – севрюга, ANUD – шип, ARUT – стерлядь.

Рисунок 32. Кластерный анализ диплоидных представителей осетровых рыб, выполненный на основании частот аллелей 12-ти микросателлитных локусов в программе *STRUCTURE*

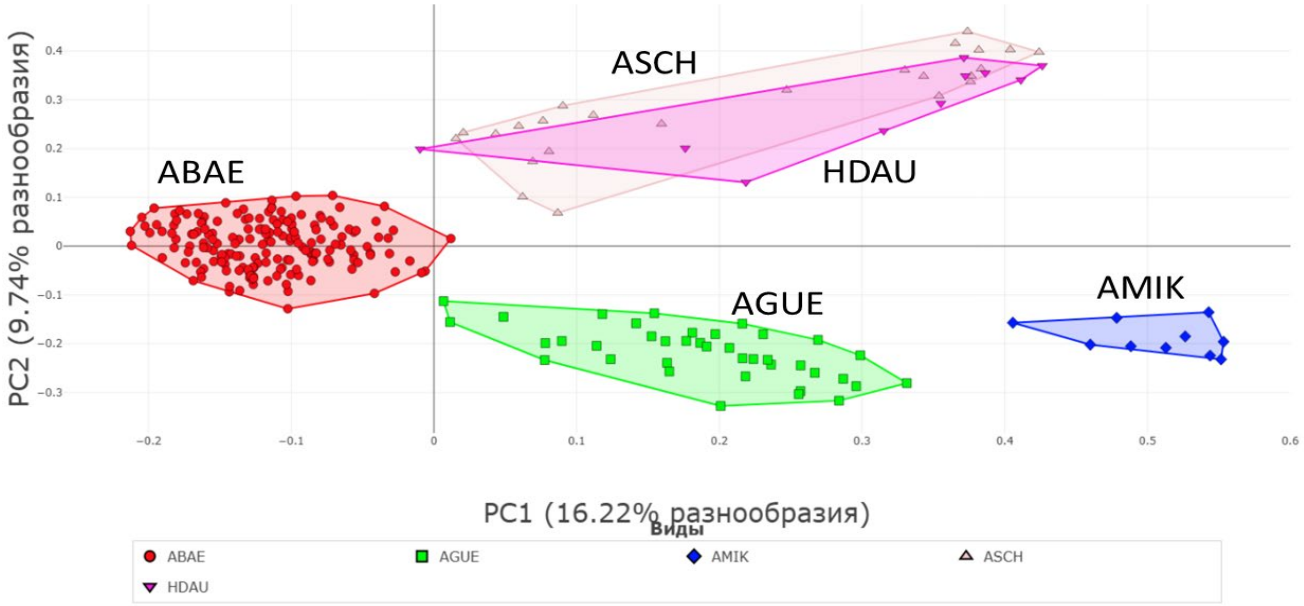
При К = 3 наблюдается объединение шипа (ANUD) и стерляди (ARUT) в один кластер, что отражает их филогенетическую близость. Увеличение числа кластеров до К = 4, позволило достичь полного разделения всех четырех диплоидных представителей.

Белуга (HUS) формирует обособленный кластер с высокими значениями коэффициента Q (0,996). Севрюга (ASTEL) также образует отдельный кластер со значениями Q (0,995). Стерлядь (ARUT) демонстрирует четкую видовую идентичность с максимальными значениями коэффициента Q (0,996).

При дальнейшем увеличении числа кластеров до К = 5 наблюдается разделение кластера севрюги (ASTEL) на две группы. Одна часть особей севрюги сохраняет высокую принадлежность к своему кластеру, тогда как у другой части появляется дополнительная генетическая компонента. Это может быть обусловлено происхождением исследованных особей севрюги из разных рыбоводных хозяйств. Белуга, шип и стерлядь сохраняют свои индивидуальные кластеры без дополнительного разделения.

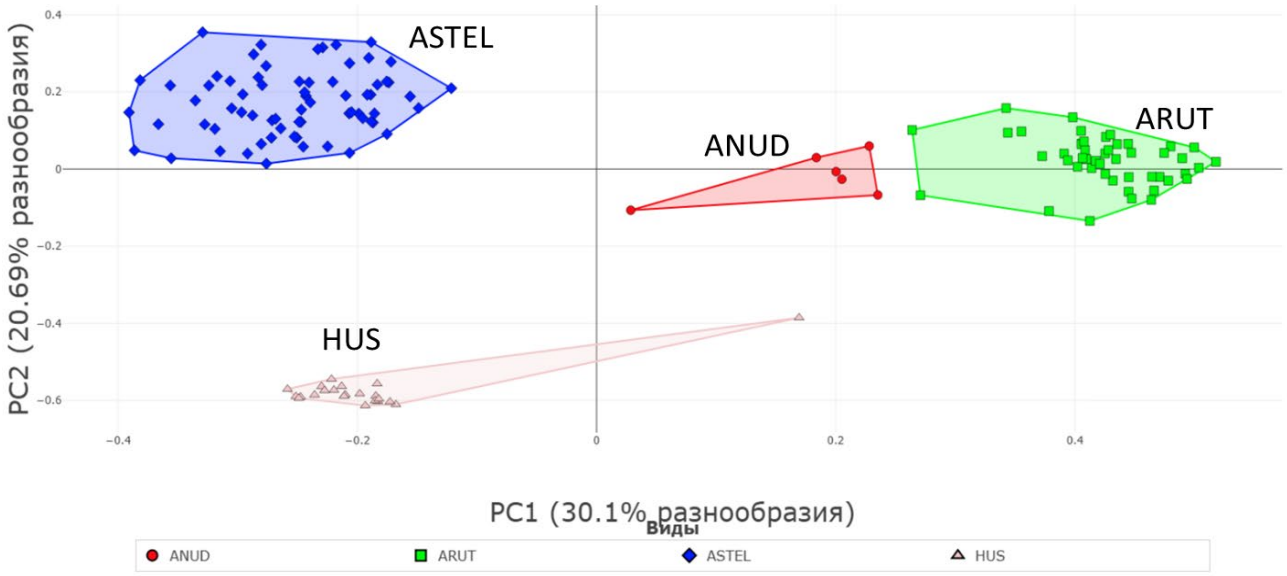
При анализе результатов кластеризации диплоидных видов обращает на себя внимание наличие у одного из образцов белуги (HUS) генетической примеси *Q* (0,490), соответствующей кластеру стерляди (ARUT) при *Q* (0,486). Данный результат может свидетельствовать о гибридном происхождении этой особи. Наиболее вероятным представляется ее принадлежность к гибриду «бестер» – известной в аквакультуре гибридной форме, полученной в результате скрещивания белуги (*Huso huso*) и стерляди (*Acipenser ruthenus)*.

Дополнительно проведен PCoA – анализ для тетраплоидной и диплоидной групп осетровых (рис. 33 – 34), подтвердивший дифференциацию исследуемых видов.



Примечание: ABAE – сибирский осетр ленского происхождения (общая выборка), ASCH – амурский осетр, AGUE – русский осетр, AMIK – сахалинский осетр, HDAU – калуга.

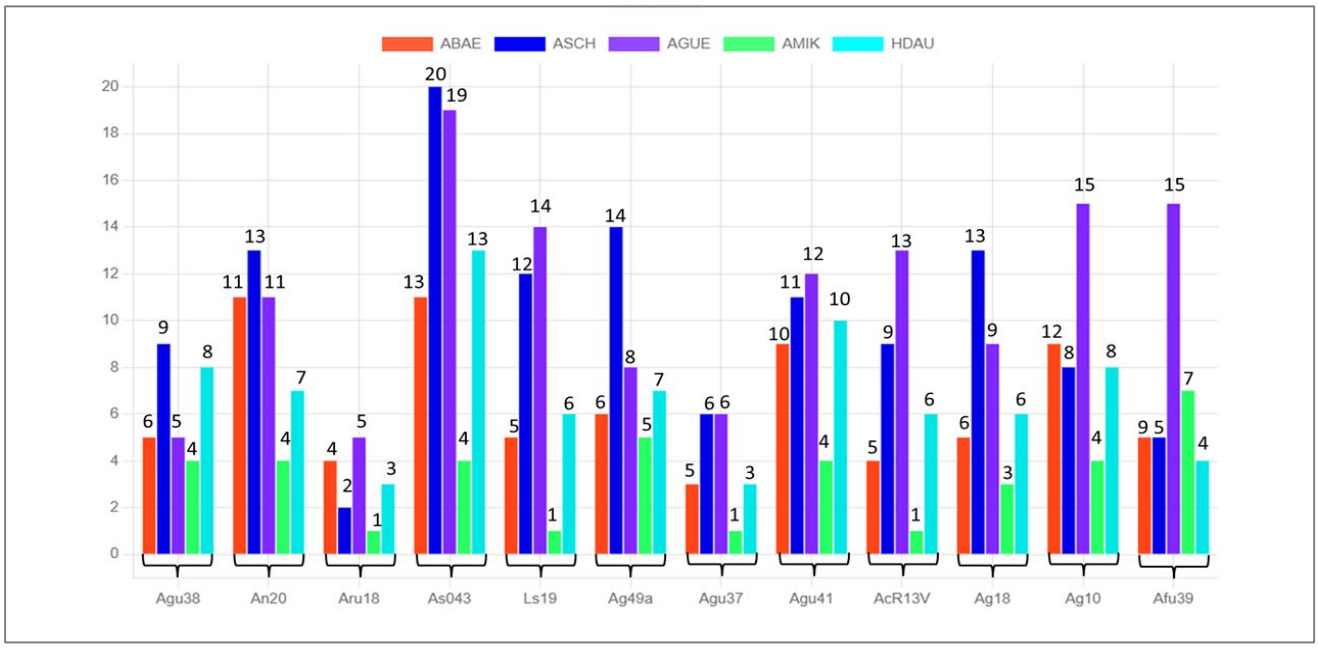
Рисунок 33. Локализация особей 4n – группы осетровых в пространстве двух измерений на основании генотипирования по 12-ти микросателлитным маркерам



Примечание: HUS – белуга, ARUT – стерлядь, ASTEL – севрюга, ANUD – шип.

Рисунок 34. Локализация особей 2n-группы осетровых в пространстве двух измерений на основании генотипирования по 12-ти микросателлитным маркерам

Детальный анализ распределения аллелей по 12 микросателлитным локусам выявил существенные различия в уровне аллельного полиморфизма между видами с разным уровнем плоидности (рис. 35 – 36).

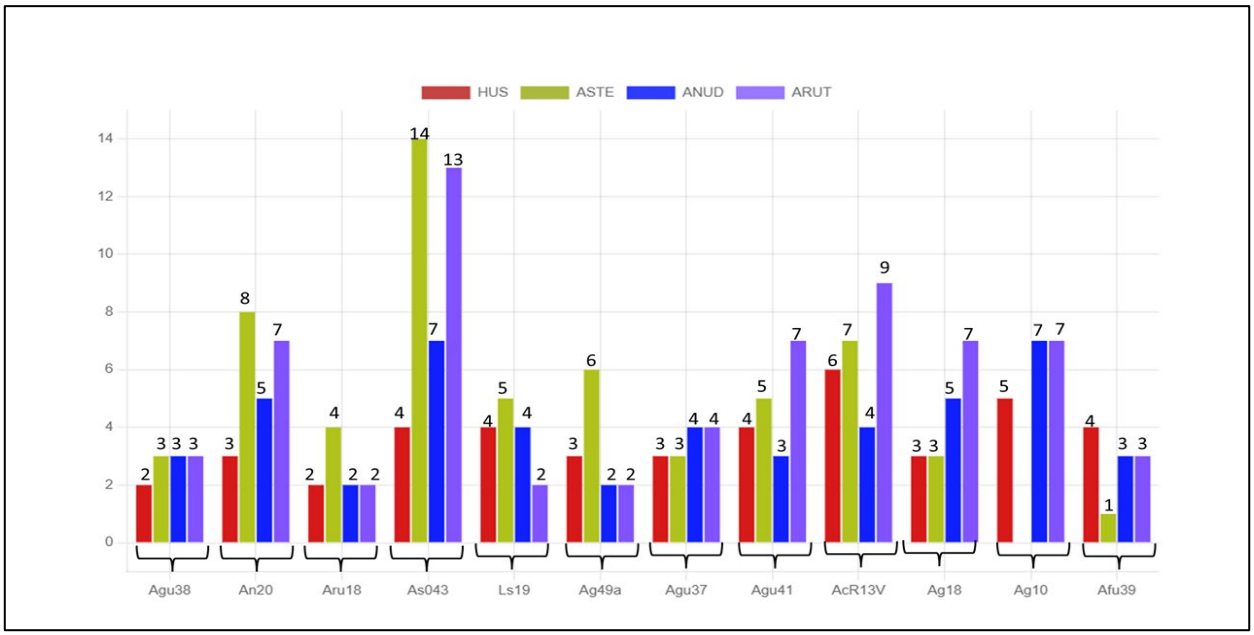


Примечание: по оси абсцисс – обозначения микросателлитных локусов; по оси ординат – количество выявленных аллелей. ABAE – сибирский осетр ленского происхождения (общая выборка), ASCH – амурский осетр, AGUE – русский осетр, AMIK – сахалинский осетр, HDAU – калуга.

Рисунок 35. Количество аллелей по 12-ти микросателлитным локусам у тетраплоидных представителей осетровых

Среди тетраплоидных видов максимальное количество аллелей на локус наблюдалось у амурского (ASCH) и русского (AGUE) осетров. По ряду локусов *(As043, An20, Ls19, Agu41)* число аллелей достигало 15 – 20. Сибирский осетр (ABAE) демонстрирует умеренный полиморфизм (до 10 – 13 аллелей по локусам *An20, As043, Ag10*). Локус *As043* высокоинформативен для всех тетраплоидных представителей (до 20 аллелей).

Среди диплоидных видов наибольшее число аллелей отмечено у стерляди (ARUT): 7 – 13 по *As043, An20, Ag10, AcR13V*; у шипа (ANUD) число аллелей варьирует от 2 – 3 (*Aru 18, Agu38, Ag49a, Agu41, Afu39*) до 5-7 аллелей в локусах *An20, As043, Ag19, Ag10.*



Примечание: по оси абсцисс – обозначения микросателлитных локусов; по оси ординат – количество выявленных аллелей. HUS – белуга, ASTEL – севрюга, ANUD – шип, ARUT – стерлядь.

Рисунок 36. Количество аллелей по 12-ти микросателлитным локусам у диплоидных представителей осетровых

Севрюга (ASTEL) демонстрирует средний уровень полиморфизма по локусам: *As043* (14 аллелей) и *Agu41* (около 5 аллелей), при этом по локусу *Ag10* амплификация не идет. Белуга (HUS) характеризуется наименьшим полиморфизмом (не более 5 – 6 аллелей на локус).

Анализ частот аллелей выявил характерные для каждого вида высокочастотные аллели. Для сахалинского осетра (AMIK) наблюдается мономорфизм: по локусам: *Aru18* (139 п.н., 1,00), *Ls19* (129 п.н., 1,00), *Agu37* (124 п.н., 1,00) и *AcR13V* (111 п.н., 1,00) (табл. 35, 36).

Таблица 35 – Аллели с высокой частотой у осетровых рыб по микросателлитным локусам: *Agu38, An20, Aru18, As043, Ls19, Ag49a*

Группы/ Локусы	***Agu38***	***An20***	***Aru18***	***As043***	***Ls19***	***Ag49a***
Тетраплоидные представители (4n)						
ABAE	**108** (0,49)	**157** (0,19); **164** (0,21); **152** (0,14)	**137**(0,83)	**270** (0,12); **262** (0,21); **268** (0,14)	**139**(0,56); **135**(0,25) **141**(0,14)	**202** (0,58); **192** (0,23) **206** (0,11)
ASCH	**108** (0,29); **110** (0,22)	**131** (0,29); **123** (0,11); **164** (0,09)	**137** (0,95)	**258** (0,13); **220** (0,11); **274** (0,13)	**125** (0,29); **123** (0,16), **135** (0,16)	**202** (0,47); **226** (0,11)

Группы/ Локусы	*Agu38*	*An20*	*Aru18*	*As043*	*Ls19*	*Ag49a*
AGUE	**108** (0,47); **110** (0,27)	**173** (0,46); **160** (0,24)	**137** (0,92)	**256** (0,20); **268** (0,19)	**139** (0,15); **133** (0,22); **147** (0,18)	**202** (0,65)
AMIK	**116** (0,53)	**177** (0,58)	**139** (1,00)	**284** (0,33); **280** (0,30)	**129** (1,00)	**192** (0,48); **216** (0,20); **204** (0,20)
HDAU	**126** (0,33); **110** (0,15); **128** (0,20)	**143**(0,38); **165** (0,28)	**139** (0,68); **137** (0,25)	**262** (0,15); **234** (0,15); **320** (0,13)	**123**(0,45); **115**(0,20); **139** (0,20)	**202** (0,38); **196** (0,20); **236** (0,20)
Диплоидные представители (2n)						
HUS	**122** (0,98)	**143** (0,68); **137** (0,30)	**139** (0,98)	**206** (0,43); **250** (0,34)	**141**(0,55); **147** (0,39)	**186** (0,50); **192** (0,48)
ASTEL	**112** (0,80)	**135** (0,64)	**139**(0,63); **131** (0,29)	**240** (0,10); **242** (0,10); **246** (0,15)	**135**(0,48); **141** (0,24)	**208** (0,57)
ANUD	**114** (0,75)	**161** (0,46); **147** (0,42)	**143** (0,92)	**284** (0,29); **254** (0,25); **258** (0,17)	**125** (0,42); **133** (0,25); **135** (0,25)	**196** (0,83)
ARUT	**108** (0,60); **112** (0,35)	**173** (0,47); **153** (0,38)	**143** (0,82)	**230** (0,17); **234** (0,15)	**139** (0,79)	**196** (0,97)

Примечание: в скобках указана частота аллелей. ABAE – сибирский осетр ленского происхождения (общая выборка), ASCH – амурский осетр, AGUE – русский осетр, AMIK – сахалинский осетр, HDAU – калуга.

Таблица 36 – Аллели с высокой частотой у осетровых рыб по микросателлитным локусам: *Agu37, Agu41, AcR13V, Ag18, Ag10, Afu39*

Группы/ Локусы	*Agu37*	*Agu41*	*AcR13V*	*Ag18*	*Ag10*	*Afu39*
Тетраплоидные представители (4n)						
ABAE	**126** (0,53) **128** (0,32)	**189** (0,29); **177** (0,14) **191** (0,19)	**123** (0,26); **107** (0,19) **127** (0,46)	**228** (0,32); **236** (0,30) **244** (0,19)	**262** (0,17); **242** (0,15); **250** (0,19); **254** (0,16)	**125** (0,32); **128** (0,31)
ASCH	**122** (0,31); **120** (0,26)	**199** (0,20); **197** (0,15); **189** (0,27)	**97** (0,54)	**244** (0,36); **236** (0,21)	**254** (0,22); **258** (0,20); **242** (0,15)	**122** (0,70)
AGUE	**124** (0,48); **126** (0,38)	**177** (0,37); **181** (0,22)	**121** (0,26); **117** (0,24)	**224** (0,46)	**250** (0,19); **242** (0,18)	**125** (0,17); **142** (0,16); **150** (0,13)
AMIK	**124** (1,00)	**195** (0,38); **181** (0,28)	**111** (1,00)	**224** (0,93)	**238** (0,60); **250** (0,28)	**125** (0,50); **128** (0,15)
HDAU	**122** (0,90)	**169** (0,48)	**109** (0,55); **107** (0,23)	**236** (0,45); **232** (0,35)	**242** (0,38); **236** (0,45)	**120** (0,78)
Диплоидные представители (2n)						
HUS	**116** (0,50); **126** (0,30)	**179** (0,91)	**117** (0,48); **127** (0,25)	**224** (0,52); **228** (0,27)	**250** (0,52); **232** (0,23)	**120** (0,55); **130** (0,39)

Группы/ Локусы	*Agu37*	*Agu41*	*AcR13V*	*Ag18*	*Ag10*	*Afu39*
ASTEL	**126** (0,39); **128** (0,35)	**185** (0,40); **183** (0,28)	**135** (0,42)	**216** (0,81)	Амплификация не идет	**116** (1,0)
ANUD	**128** (0,50)	**181** (0,88)	**115** (0,50); **129** (0,33)	**224** (0,46); **232** (0,42)	**216** (0,33); **220** (0,33); **212** (0,17)	**138** (0,88)
ARUT	**128** (0,82)	**191** (0,40); **193** (0,40)	**127** (030); **135** (0,28); **129** (0,20)	**252** (0,31); **234** (0,27); **256** (0,20)	**242** (0,36); **246** (0,22)	**128** (0,55), **125** (0,44)

Примечание: в скобках указана частота аллелей. ABAE – сибирский осетр ленского происхождения (общая выборка), ASCH – амурский осетр, AGUE – русский осетр, AMIK – сахалинский осетр, HDAU – калуга.

Калуга (HDAU) имеет мажорные аллели: 126 п.н. (0,33) в локусе *Agu38*, 122 п.н. (0,90) в локусе *Agu37*, 169 п.н. (0,48) в локусе *Agu41*, 120 п.н. (0,78) в локусе *Afu39*. По микросателлитному локусу *Afu39* калуга и белуга имеют общий аллель 120 п.н. При этом важно отметить, что у калуги по данному локусу выявленные генетические профили соответствовали диплоидным: у всех особей детектировался либо один, либо два аллеля примерно одинакового размера. Аналогичные результаты, демонстрирующие функциональную диплоидизацию микросателлитных локусов у калуги, были получены в работе (Rajkov J. et al., 2014) при анализе 10 видов осетровых рыб.

Белуга (HUS) характеризуется аллелями: *Agu38* – 122 п.н. (0,98), *An20* – 143 п.н. (0,68), As*043* – 206 п.н. (0,43), *Ls19* – 141 п.н. (0,55), *Ag49a* – 186 п.н. (0,50), *AcR13V* – 117 п.н. (0,48), *Ag18* – 224 п.н. (0,52).

У стерляди (ARUT) высокие частоты отмечены для *An20* (173 п.н., 0,47), *Ag49a* (196 п.н., 0,97) и *Afu39* (128 п.н., 0,55). У шипа (ANUD) преобладают аллели: *An20* (161 п.н., 0,46 и 147 п.н., 0,42) и *Aru18* (143 п.н., 0,92). Для севрюги (ASTEL) по микросателлитному локусу *Afu39* наблюдается один фиксированный аллель (116 п.н., 1,00), отсутствующий у других видов, что может служить диагностическим признаком.

Сравнительный анализ распределения аллелей у русского (AGUE) и сибирского (ABAE) осетров подтвердил их высокое генетическое сходство. В

локусе *Aru18* аллель 137 п.н. доминирует у обоих видов, встречаясь у 83% представителей сибирского осетра и у 92 % русского осетра. В локусе *Agu38*, где аллель 108 п.н. встречается с частотой 0,49 у ABAE и 0,47 у AGUE соответственно. В локусе *Agu37* у сибирского преобладает аллель 126 п.н. (0,53), у русского – 124 п.н. (0,48). В локусе *An20* у сибирского осетра характерны аллели 157 п.н. (0,19) и 164 п.н. (0,21), у русского – 169 п.н. (0,45). По локусу *AcR13V* у русского осетра выявлены аллели 117 п.н. (0,24) и 121 п.н. (0,26), которые отсутствовали в выборке сибирского осетра. В выборке сибирского осетра преобладают аллели 107 п.н. (0,19) и 123 п.н. (0,26). Это может служить дополнительным критерием для видовой идентификации сибирского осетра.

Таким образом, проведенный микросателлитный анализ для девяти видов осетровых позволил охарактеризовать уровень их генетического разнообразия, популяционную структуру и степень межвидовой дифференциации. Выявлены диагностические аллели для сахалинского осетра (AMIK) и севрюги (ASTEL), для остальных видов определены мажорные аллели. Дифференциация между сибирским и русским осетром была достигнута исключительно с помощью программного обеспечения STRUCTURE (на основании расчета коэффициента подобия Q) и методом главных координат (PCoA) на основе матриц генетических расстояний.

3.8 Составление индивидуальных и групповых генетических паспортов для сибирского осетра ленской популяции, разводимого в условиях аквакультуры

Сибирский осетр (*Acipenser baerii*) – вид, находящийся под угрозой исчезновения на значительной части своего естественного ареала. С целью восстановления популяций осетра и обеспечения сохранения этого вида, многие страны прибегают к программе разведения осетров в аквакультуре с последующим выпуском в естественную среду обитания. Однако, для успешной реализации этой стратегии необходимо учитывать множество факторов, включая генетические аспекты, которые играют важную роль в адаптации и выживании видов. Важным требованием при выпуске молоди в природные водоемы, является сопоставимость

генетических профилей выпускаемой рыбы с профилями диких популяций, обитающих в конкретных водоемах – это необходимо для сохранения особенностей генетической структуры нативных популяций.

Разработка надежных генетических маркеров позволяет не только идентифицировать сибирского осетра, но и отслеживать его происхождение, определять генетическое разнообразие популяций, контролировать качество продукции осетроводства и выявлять случаи межвидовой гибридизации.

На основе проведенных молекулярно-генетических исследований была разработана система генетической паспортизации сибирского осетра, разводимого в условиях аквакультуры. Генетический паспорт представляет собой набор данных, содержащий генетический профиль конкретной особи или группы рыб, включающий результаты генотипирования по микросателлитным маркерам, а также информацию о происхождении и фенотипических характеристиках.

Для определения видовой чистоты и выявления гибридного происхождения представителей сибирского осетра используются 12 микросателлитных локусов, представленных ранее. Пример индивидуального генетического паспорта особи сибирского осетра ленского происхождения (*Acipenser baerii*) представлен ниже (табл. 37).

Таблица 37 – Пример генетического паспорта сибирского осетра (*Acipenser baerii*)

<table>
<tr><td colspan="8">Сибирский осетр ленское происхождение (Acipenser baerii)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Индивидуальный номер</td><td colspan="4">28042</td><td colspan="2" rowspan="4"></td></tr>
<tr><td colspan="2">Возраст</td><td colspan="4">Апрель 2022</td></tr>
<tr><td colspan="2">№ ВИЖ</td><td colspan="4">F_AB1288</td></tr>
<tr><td colspan="2">Происхождение (хозяйство)</td><td colspan="4">ООО РТФ «Диана», Вологодская обл., Кадуйский район</td></tr>
<tr><td colspan="2">Владелец</td><td colspan="6">ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста</td></tr>
<tr><td colspan="2">Пол</td><td colspan="6">♂ Самец</td></tr>
<tr><td colspan="8">Генетический профиль по микросателлитным маркерам</td></tr>
<tr><td colspan="2">Agu38</td><td colspan="2">An20</td><td colspan="2">Aru18</td><td colspan="2">As043</td></tr>
<tr><td>108</td><td>108</td><td>139</td><td>152</td><td>137</td><td>137</td><td>242</td><td>242</td></tr>
<tr><td>110</td><td>114</td><td>152</td><td>161</td><td>137</td><td>143</td><td>252</td><td>254</td></tr>
<tr><td colspan="2">Ag49a</td><td colspan="2">Agu37</td><td colspan="2">Ls19</td><td colspan="2">Agu41</td></tr>
<tr><td>196</td><td>202</td><td>126</td><td>126</td><td>135</td><td>139</td><td>177</td><td>177</td></tr>
<tr><td>202</td><td>218</td><td>126</td><td>128</td><td>139</td><td>139</td><td>181</td><td>189</td></tr>
</table>

Микросателлитный профиль						
Ag18		**Ag10**		**AcR13V**	**Afu39**	
228	232	242	242	107	122	124
236	244	258	262	123	125	128
Гаплотип (мтДНК): неизвестно						
SNP генотип: неизвестно						
Фенотипические показатели						
Дата измерений		17.01.2023		09.06.2023	07.12.2023	
Живая масса, г		309		409	550	
Общая длина, см		49,5		53	58	
Промысловая длина, см		41,5		45,5	50	
Длина головы, см		10,5		11,2	12,5	
Обхват тела, см		14		15,5	17	
Высота тела, см		4,7		4,8	5,5	

На основании выполненных исследований, разработанная тест-система предоставляет широкие возможности для анализа генетического разнообразия и родословной особей сибирского осетра. На практике, для решения рутинных задач, таких как видовая идентификация или простое родственное сопоставление при достаточном полиморфизме в тестируемой выборке достаточно использовать 5 – 8 микросателлитных локусов (1 и 2 панель). Однако в случаях, требующих более глубокого генетического анализа, особенно в ситуациях, связанных с близкородственным скрещиванием, необходимо задействовать комплексную тест-систему, включающую полный набор из 12-ти микросателлитных локусов.

На основе собранных данных разработан генетический паспорт, который включает информацию о происхождении конкретной особи, ее генетический профиль, гаплотип мтДНК (при необходимости), дата рождения, результаты SNP-генотипирования (при необходимости), пол и т.д. Внедрение системы генетической паспортизации позволит рыбоводным хозяйствам принимать обоснованные решения при выборе особей для создания наилучших родительских пар. Это способствует минимизации инбридинга и сохранению генетического разнообразия.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработка мультиплексной тест–системы микросателлитных локусов для генетической паспортизации сибирского осетра.

В России уже существует и успешно применяется ряд отечественных разработок для генетического анализа осетровых рыб. Известной работой в этой области является мультилокусная панель из пяти микросателлитных маркеров, разработанная ученными ВНИРО (Барминцева А. Е., Мюге Н. С., 2013). Данная тест-система широко применяется для решения многих задач рыбоводной практики, в первую очередь – для подтверждения видовой и гибридной принадлежности особей осетровых рыб. Кроме того, на рынке представлено готовое коммерческое решение – тест-система «ГенЭксперт – Осетр» (7 STR–локусов) производства НПК «Синтол», ориентированная на задачах генетической паспортизации и определения родства.

Представленная в настоящей работе тест-система дополняет существующие методы генетического анализа. Ее использование позволяет не только проводить идентификацию, но и за счет расширенного состава STR-маркеров получать более детальную характеристику генетической структуры стад, что важно для селекционно-племенной работы. Разработанная мультиплексная панель микросателлитных маркеров доказала свою высокую эффективность для генетической паспортизации, идентификации популяционной принадлежности и оценки генетического разнообразия сибирского осетра в условиях аквакультуры. В целом, большинство проанализированных стад сохраняют относительно высокий уровень генетического разнообразия. Также, перед выпуском молоди сибирского осетра в естественные популяции целесообразно проводить сравнение генетических профилей диких и выпускаемых рыб с целью контроля и сохранения особенностей генетической структуры нативных популяций.

Разработка референсной системы контроля длин микросателлитных локусов

Предыдущие исследования выявили необходимость создания новых панелей микросателлитных маркеров (Бардуков и др., 2024) для проведения тестирования особей сибирского осетра ленской аквакультуры. Во многих случаях для

надежного выявления родственных связей рыб, разводимых в пределах одного хозяйства и, по этой причине обладающих сниженным генетическим разнообразием, потребовалось большее количество STR-маркеров, чем в существующих панелях (Мюге Н. С., Барминцева А. Е., 2020), (https://www.syntol.ru/), которые с успехом применяются в исследованиях экологической направленности. В этой связи существует необходимость приведения длин аллелей, используемых в настоящем исследовании микросателлитных локусов к реальным, а не оценочным значениям. При данном подходе, результаты исследований могут быть относительно просто адаптированы для сравнения с данными, полученными любыми другими исследователями.

Методы контроля длин микросателлитных локусов для повышения точности генетической паспортизации и возможности сравнения результатов, полученных в разных лабораториях, активно разрабатывались с момента внедрения в практику STR-анализа при работе с самыми различными объектами. С самого начала проведения работ по генетической паспортизации авторами многих работ была определена необходимость организации межлабораторного сотрудничества, предполагающего обмен контрольными образцами и стандартизацию методик проведения анализа (Stephenson J. J. et al., 2009), что, впрочем, не гарантировало полного совпадения результатов (Doveri S. et al., 2008). Типичным решением для приведения к общему стандарту данных микросателлитного генотипирования является применение аллельных лестниц, которые также должны совпадать в лабораториях, выполняющих данный анализ (Garcia-Hermoso D. et al., 2010; Rathmacher G. et al., 2009; Ellis J. S. et al., 2011).

Очевидно, что при работе с новым объектом, либо при отсутствии хорошо налаженного межлабораторного взаимодействия, а также при необходимости ввода дополнительных микросателлитных маркеров проблема получения надежных воспроизводимых результатов микросателлитного анализа может возникнуть снова.

Представленный методический подход может дополнить арсенал уже имеющихся методов и успешно применяться для контроля результатов

микросателлитного анализа, особенно для тех видов животных или растений, для которых процедура микросателлитного анализа не стандартизирована. Вместе с тем разработанная тест-система не является полной заменой секвенированию для выявления реальных значений длин ампликонов, так как на электрофоретическую подвижность фрагмента ДНК могут оказывать воздействие дополнительные факторы, такие, как например возможное образование вторичных структур ДНК или особенности используемых реактивов и оборудования для генетического анализа.

Анализ характера наследования микросателлитных локусов

В настоящем исследовании для локуса *AcR13V* было установлено дисомное наследование, что делает его уникальным среди 12 проанализированных микросателлитных маркеров сибирского осетра.

Диплоидные локусы обладают важными преимуществами при установлении достоверности происхождения. В отличие от тетрасомных маркеров, требующих анализа множества комбинаций гамет (до 36 вариантов на пару родителей) и допускающих неоднозначную интерпретацию, диплоидные локусы подчиняются классическим менделевским закономерностям. Это позволяет: однозначно определять передачу аллелей от каждого родителя, рассчитывать стандартные вероятности исключения отцовства, использовать общедоступное программное обеспечение для родственного анализа без необходимости адаптации к полиплоидному геному (Wang J. et al., 2022).

Применение описанных выше преимуществ диплоидного наследования в полной мере возможно лишь при точном знании хромосомной локализации маркера, что в данном случае непосредственно подводит к анализу положения локуса *AcR13V* на хромосоме 13 референсного генома стерляди. Полученные в настоящем исследовании данные, свидетельствуют о возможных хромосомных перестройках, затронувших структуру хромосомы 13 (по геному стерляди) в ходе эволюции генома осетровых. Согласно современным представлениям, кариотип этих рыб сформировался в результате двух последовательных раундов дупликации всего генома (*AcR1* и *AcR2*), после чего начались процессы редиплоидизации,

протекающие с разной скоростью в различных участках генома. Как показано в работе (Biltueva L. et al., 2020) с использованием хромосомно-специфичных зондов, эволюция осетровых сопровождалась множественными меж- и внутрихромосомными перестройками, включая центромерные разрывы, слияния и транслокации. Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что хромосома 13 также вовлечена в подобные изменения. Один из возможных сценариев: в процессе полиплоидизации, либо последующей редиплоидизации данный хромосомный участок претерпел структурные изменения.

Другое объяснение носит методологический характер и связано с возможными ошибками сборки референсного генома стерляди (*Acipenser ruthenus*), так как поиск и картирование микросателлитных локусов *AcR13V, AcR13-82, AcR13-2, AcR13-45, AcR13-97* выполнялись на его основе. Сборка полиплоидных геномов (а в случае стерляди – функционального диплоида) сопряжена с техническими трудностями, поэтому нельзя исключать, что локус *AcR13V* ошибочно отнесен к хромосоме 13. В таком случае выявленные различия в типах наследования могут объясняться локализацией этого локуса на другой хромосоме, а не хромосомными перестройками.

Таким образом, вопрос о природе выявленного различия в характере наследования хромосомы 13 остается открытым и требует уточнения в ходе дальнейших исследований.

Характеристика генетического разнообразия ремонтно-маточных стад сибирского осетра ленской популяции

Полученные в настоящем исследовании данные о генетическом разнообразии и структуре пяти ремонтно - маточных стад (РМС) сибирского осетра ленской популяции позволяют провести сопоставление с результатами, представленными в работе (Барминцевой А.Е., Мюге Н.С., 2018), в которой авторы на основании анализа пяти микросателлитных локусов и контрольного региона мтДНК выявили разделение аквакультурных стад ленского происхождения на два обособленных кластера. Ученые показали, что в аквакультуре сибирского осетра ленского происхождения выделяются два генетических кластера. Согласно их данным,

первый («природный») объединял выборки, полученные от производителей 1990-1996 гг. рождения и характеризовался генетической близостью к природной ленской популяции. Второй («аквакультурный») формировали особи более поздних генераций (2001 г. и позже), у которых отмечалось снижением аллельного разнообразия, утрата редких аллелей и наличие инбридинга. Указанные изменения авторы связывают с селекционной работой, проводимой на Конаковском осетровом заводе при выведении одомашненной формы ленского осетра (1993 г.) и породы «Лена – 1» (2008 г.), в ходе которой использовалось ограниченное число производителей, что привело к проявлению эффекта основателя и усилению генетического дрейфа.

В настоящем исследовании подобная закономерность, основанная на генерационной принадлежности особей, не повторилась. Вместо этого выявлена генетическая дифференциация особей сибирского осетра в зависимости от их происхождения. Учитывая временной промежуток проводимых исследований, то наиболее вероятным объяснением может оказаться постепенное накопление различий частот аллелей в современных стадах сибирского осетра в связи с проводимой селекционной работой.

Сравнительный анализ генетического полиморфизма представителей семейства *Acipenseridae*

В настоящей работе с использованием набора микросателлитных маркеров, ставилась задача выявить четкие видоспецифичные аллели с высокой частотой встречаемости, которые позволяли бы надежно дифференцировать сибирского и русского осетра. В связи с этим, дифференциация данных видов достигалась только за счет выделения кластеров на основании коэффициента подобия Q, формируемого по совокупности частот аллелей тестируемых образцов (STRUCTURE), а также с помощью анализа главных координат (PCoA).

Данный результат не является неожиданным и согласуется с работами других авторов (Барминцевой А. Е., Мюге Н. С., 2013; Rajkov J. et al., 2014), указывающими на генетическое сходство этих видов, обусловленное их филогенетической близостью и исторической интрогрессией.

Учитывая широкую распространенность на осетровых рыбоводных заводах гибрида «ролик» (гибрид русского осетра и сибирского осетра ленской популяции), необходим дальнейший поиск более надежного ядерного маркера для идентификации событий гибридизации. В частности, при использовании материнской линии русского осетра в скрещиваниях этих двух видов, найденные ранее межвидовые митохондриальные различия (Барминцевой А. Е., Мюге Н. С., 2013) могут оказаться малоинформативными, поскольку фенотип русского осетра является доминантным по большинству признаков. При дальнейшем снижении доли кровности сибирского осетра (например, при возвратном скрещивании гибрида с русским осетром) повышается вероятность ошибок как визуального определения гибридной особи, так и кластеризации по рассмотренным микросателлитным локусам – ввиду отсутствия видоспецифичных аллелей.

ВЫВОДЫ

1. В результате анализа более 48-ми микросателлитных локусов, описанных в литературе для различных видов осетровых, разработана мультиплексная тест-система, включающая 12 высокополиморфных маркеров: *An20, Aru18, Agu38, As043, Ag49a, Agu37, Ls19, Agu41, AcR13V, Ag18, Ag10, Afu39.* Отобранные локусы позволяют достоверно определять количественное соотношение аллелей. Разработанная панель пригодна для генетической паспортизации, оценки генетического разнообразия и контроля происхождения сибирского осетра в аквакультуре.

2. Разработан и апробирован метод стандартизации длин аллелей микросателлитных локусов для сибирского осетра. Предложенный метод основан на использовании референсных фрагментов ДНК известной длины, меченных универсальным флуоресцентным праймером (M-13FAM), что способствует снижению погрешности определения размеров аллелей до 0,2 п.н. Применение разработанного подхода обеспечивает повышение точности и межлабораторной воспроизводимости результатов генотипирования, что особенно важно при отсутствии стандартизированных международных панелей для полиплоидных видов осетровых.

3. На основании анализа экспериментальных семей (144 потомка от 6 групп скрещиваний) установлен характер наследования 12-ти микросателлитных локусов. Для 10-ти локусов *(An20, Aru18, Agu38, As043, Agu37, Ls19, Agu41, Ag18, Ag10, Afu39)* не исключается диплоидизированный тетрасомный тип наследования, что свидетельствует о частичной редиплоидизации этих хромосомных участков в геноме сибирского осетра. Локус *Ag49a* продемонстрировал тетрасомный тип наследования. Локус *AcR13V* показал дисомный тип наследования. Данная особенность делает локус *AcR13V* удобным маркером для достоверного установления родства, так как он подчиняется классическим закономерностям наследования и не требует учета множественных аллельных комбинаций, характерных для тетрасомных локусов.

4. Оценка генетического разнообразия аквакультурных стад сибирского осетра ленской популяции выявила значительную вариабельность. Наибольшие показатели отмечены для групп ООО РТФ «Диана» (H_E = 0,666; A_R = 6,006) и осетровое хозяйство в Удомле (H_E = 0,679; A_R = 5,434), тогда как группа Можайского производственно-экспериментального рыбоводного завода характеризовалась умеренным уровнем разнообразия (H_E = 0,591; A_R = 4,379). Установлена выраженная генетическая дифференциация между группами, при этом стадо Можайского производственно-экспериментального рыбоводного завода является наиболее генетически обособленным. Этот эффект может быть следствием ориентации завода на выпуск молоди осетровых для восполнения природных популяций и более строгих требований к происхождению производителей.

5. Разработанная тест-система из 12-ти микросателлитных локусов обеспечивает надежную идентификацию большинства исследованных видов семейства Acipenseridae. Для сахалинского осетра и севрюги выявлены диагностические аллели, что позволяет проводить их видовую идентификацию без применения дополнительных маркеров. В то же время для сибирского и русского осетров четких видоспецифичных аллелей не выявлено: идентификация этих видов возможна только при выделении кластеров на основании коэффициента подобия Q, а также анализа главных координат (PCoA). Высокое генетическое сходство этих видов определяет необходимость дальнейшего поиска более надежных ядерных маркеров (например, SNP-панелей).

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

Осетровым рыбоводным хозяйствам целесообразно внедрить генетическое тестирование особей сибирского осетра из ремонтно-маточных стад с применением разработанной панели микросателлитных локусов. Такой подход позволит минимизировать инбридинг и формировать родительские пары с наибольшей генетической удаленностью друг от друга.

Для стандартизации микросателлитного анализа в генетических лабораториях предлагается метод калибровки на основе референсных фрагментов ДНК: он минимизирует ошибки определения длин аллелей, связанные с применением разных флуоресцентных меток или различиями в условиях электрофореза, и обеспечит сопоставимость результатов. При разработке панелей микросателлитных локусов также эффективно использовать метод встройки флуоресцентной метки универсального праймера М-13 вместо синтеза каждого прямого праймера с индивидуальным флуорофором. Это снижает затраты на первичную отработку, так как более половины протестированных маркеров отбраковывается, а применение М-13 на этапе тестирования новых STR- маркеров позволит избежать расходов на синтез меченых праймеров для непригодных локусов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Сибирский осетр традиционно рассматривается как функциональный тетраплоид, однако полученные данные в настоящем исследовании указывают на незавершенность редиплоидизации и неравномерную плоидность генома. Дальнейшее изучение организации генома сибирского осетра с применением современных молекулярно-генетических методов позволит выявить его уникальные особенности – определить хромосомы, обладающие нетипичным по отношению к геному характером наследования, затем – идентифицировать дивергировавшие хромосомные регионы, способствующие процессу диплоидизации. Определение подобных локусов, а также характерных для них типов мутаций необходимо для понимания общих закономерностей эволюции осетровых.

Создание «карты плоидности генома» сибирского осетра помимо теоретического будет иметь и практическое значение – информация о копийности и характере наследования хромосом, на которых расположены гены, ответственные за формирование хозяйственно-полезных признаков, будет востребована при ведении селекционной работы с сибирским осетром.

Список использованной литературы

1. Астафьева, С. С. Физиологическое состояние гибрида русский осетр × сибирский осетр (Acipenser gueldenstaedtii × Acipenser baerii) при выращивании в садках в дельте Волги / С. С. Астафьева, А. Р. Лозовский // Рыбоводство и рыбное хозяйство. – 2022. – Т. 16, № 3(194). – С. 190–200. – doi: 10.33920/sel-09-2203-03.

2. Атлас пресноводных рыб России: в 2 т. Т. 1 / под ред. Ю. С. Решетникова. – Москва: Наука, 2003. – 379 с.

3. Бардуков, Н. В. Методические рекомендации по генетической паспортизации сибирского осетра (Acipenser baerii) ленской популяции аквакультурного происхождения / Н. В. Бардуков, А. К. Никипелова, В. И. Никипелов, П. И. Отраднов, А. А. Белоус, Н. А. Зиновьева. – Дубровицы: ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2025. – 36 с.

4. Бардуков, Н. В. Определение достоверности происхождения сибирского осетра на основе результатов микросателлитного анализа и коэффициентов генетического сходства / Н. В. Бардуков, А. К. Никипелова, П. И. Отраднов, В. И. Никипелов, А. А. Белоус // Животноводство и кормопроизводство. – 2024. – Т. 107, № 4. – С. 106–119. – doi: 10.33284/2658-3135-107-4-106.

5. Барминцева, А. Е. Генетический полиморфизм сибирского осетра Acipenser baerii Brandt, 1869 в аквакультуре / А. Е. Барминцева, Н. С. Мюге // Генетика. – 2018. – Т. 54, № 2. – С. 216–223. – doi: 10.7868/S0016675818020030.

6. Барминцева, А. Е. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (Acipenseridae) и выявления особей гибридного происхождения / А. Е. Барминцева, Н. С. Мюге // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 9. – С. 1093. – doi: 10.7868/S0016675813090038.

7. Барминцева, А. Е. Природный генетический полиморфизм и филогеография сибирского осетра Acipenser baerii Brandt, 1869 / А. Е. Барминцева, Н. С. Мюге // Генетика. – 2017. – Т. 53, № 3. – С. 345–355. – doi: 10.7868/S001667581703002X.

8. Барминцева, А. Е. Филогеография и внутривидовой генетический полиморфизм сибирского осетра Acipenser baerii Brandt, 1869 в природе и

аквакультуре: дис.. канд. биол. наук: 03.02.07 / А. Е. Барминцева. – Москва, 2018. – 145 с.

9. Бурцев, И. А. Временные руководящие указания по селекционно-племенной работе с гибридами осетровых рыб / И. А. Бурцев, Е. В. Серебрякова, А. И. Николаев. – Москва: Изд-во ВНИРО, 1978. – 16 с.

10. Бурцев, И. А. Новый объект товарного осетроводства – гибрид русского и сибирского осетров (Acipenser guldenstadtii Br. × A. baerii Br.) / И. А. Бурцев, А. И. Николаев, А. Г. Слизенко // Сборник научных трудов по выращиванию морских организмов. – Москва: Изд-во ВНИРО, 1985. – С. 112–116.

11. Васильева, Л. М. Особенности современного состояния искусственного воспроизводства осетровых рыб в Волго-Каспийском бассейне / Л. М. Васильева, В. В. Наумов, Н. В. Судакова // Естественные науки. – 2015. – № 4(53). – С. 90–95.

12. Вилкова, О. Ю. Состояние популяции сибирского осетра среднего течения реки Лена в летний период / О. Ю. Вилкова, Е. В. Бурмистров, Ю. А. Свешников // Труды ВНИРО. – 2023. – Т. 194. – С. 37–43. – doi: 10.36038/2307-3497-2023-194-37-43.

13. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Том 2. Породы животных. Лена-1 (осетр сибирский). – Режим доступа: https://gossortrf.ru/registry/gosudarstvennyy-reestr-selektsionnykh-dostizheniy-dopushchennykh-k-ispolzovaniyu-tom-2-porody-zhivot/lena-1-osetr-sibirskiy-9463263/ (дата обращения: 10.05.2025).

14. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Том 2. Породы животных. Одомашненная форма осетр сибирский. – Режим доступа: https://gossortrf.ru/registry/gosudarstvennyy-reestr-selektsionnykh-dostizheniy-dopushchennykh-k-ispolzovaniyu-tom-2-porody-zhivot/odomashnennaya-forma-osetr-sibirskiy-9357522/ (дата обращения: 10.05.2025).

15. Дрягин, П. А. Промысловые рыбы Обь-Иртышского бассейна / П. А. Дрягин // Известия Всесоюзного института озерного и речного рыбоводства. – 1948. – Т. 25, № 2. – С. 3–104.

16. Егоров, А. Г. Байкальский осетр Acipenser baerii stenorrhynchus natio baicalensis А. Никольского. Систематика, биология, промысел, сырьевая база и воспроизводство запасов / А. Г. Егоров. – Улан-Удэ, 1961. – 121 с.

17. Зиновьева, Н. А. Фенотипические показатели сибирского осетра, разводимого в условиях замкнутого водоснабжения: свидетельство о гос. регистрации базы данных № 2024620556 / Н. А. Зиновьева, А. К. Никипелова, В. И. Никипелов, Н. В. Бардуков, Т. В. Карпушкина, А. А. Белоус. Заявитель и правообладатель ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста. – № заявки 2024620192; заявл. 25.01.2024; опубл. 05.02.2024.

18. Кириллов, Ф. Н. Рыбы реки Индигирки / Ф. Н. Кириллов // Известия ВНИИ озерного и речного рыбоводства. – 1955. – Т. 35. – С. 141–167.

19. Корентович, М. А. Первые результаты работ по одомашниванию и искусственному воспроизводству сибирского осетра ленской популяции на Чернышевском рыбоводном заводе (Якутия) / М. А. Корентович, А. Г. Егоров // Достижения молодежной науки для агропромышленного комплекса: сборник трудов LVII научно-практической конференции. – Тюмень: ГАУ Северного Зауралья, 2023. – Т. Часть 13. – С. 52–58.

20. Кузьмин, Е. В. Альбуминовая система сыворотки крови осетрообразных в речной период жизни / Е. В. Кузьмин // Вопросы ихтиологии. – 1996. – Т. 36, № 1. – С. 101–108.

21. Майоров, Д. А. Сибирский осетр (Acipenser baerii) ленской популяции: краткая история введения в аквакультуру и мероприятия по обновлению генофонда / Д. А. Майоров, В. Е. Хрисанфов // Рыбное хозяйство. – 2016. – № 6. – С. 86–88.

22. Малютин, В. С. К истории рыбоводного освоения сибирского осетра Acipenser baerii реки Лена для целей акклиматизации и товарного выращивания / В. С. Малютин, Г. И. Рубан // Вопросы ихтиологии. – 2009. – Т. 49, № 3. – С. 389–395.

23. Мельченков, Е. А. Сравнительная оценка продукционного потенциала двухлетков межродовых гибридных форм сибирского и русского осетров (сибирский осетр×белуга, русский осетр×калуга, русский осетр×белуга) в условиях УЗВ / Е. А. Мельченков, А. П. Воробьев, А. А. Арчибасов и др. // Состояние и пути

развития аквакультуры в Российской Федерации: материалы VIII конференции. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2023. – С. 137–143.

24. Мюге, Н. С. 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 // Вестник Российского фонда фундаментальных исследований. – 2020. – № 2(106). – С. 78–87. – doi: 10.22204/2410-4639-2020-106-02-78-87.

25. Никипелов, В. И. Разработка мультилокусной STR-панели и оценка достоверности происхождения аквакультурной стерляди (Acipenser ruthenus) / В. И. Никипелов, В. Р. Харзинова, В. В. Волкова и др. // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса. – 2024. – № 3(75). – С. 273–283. – doi: 10.32786/2071-9485-2024-03-32.

26. Официальный сайт ФГБНУ «ВНИРО». – Режим доступа: https://fish.gov.ru (дата обращения: 02.09.2025).

27. Писаренко, Н. Б. Анализ ассоциаций SNP (400 C> A) в гене IGF1 с показателями размера и массы у стерляди (Acipenser ruthenus Linnaeus, 1758) / Н. Б. Писаренко, Н. В. Бардуков, В. И. Никипелов и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2024. – Т. 59, № 4. – С. 680–691. – doi: 10.15389/agrobiology.2024.4.680rus.

28. Правдин, И. Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных) / И. Ф. Правдин. – Москва: Пищевая промышленность, 1966. – 246 с.

29. Рубан, Г. И. Acipenser baerii / Г. И. Рубан, Н. С. Мюге // The IUCN Red List of Threatened Species 2022. – DOI 10.2305/IUCN.UK.2022-1.RLTS.T244A156718817.en. – Режим доступа: https://www.iucnredlist.org/species/244/156718817 (дата обращения: 06.04.2026).

30. Рубан, Г. И. Адаптивные эколого-морфологические особенности сибирского осетра (Acipenser baerii Brandt) / Г. И. Рубан // Биология внутренних вод. – 2019. – № 2-1. – С. 71–78. – doi: 10.1134/S032096521902013X.

31. Рубан, Г. И. Сибирский осетр Acipenser baerii Brandt (за исключением популяций басс. реки Лены) / Г. И. Рубан // Красная книга Российской Федерации. – 2-е изд. – Москва: ФГБУ ВНИИ Экология, 2021. – С. 307–309.

32. Рубан, Г. И. Сибирский осетр Acipenser baerii Brandt: структура вида и экология / Г. И. Рубан; Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. – Москва: Издательство ГЕОС, 1999. – 236 с.

33. Серебрякова, Е. В. Некоторые данные о хромосомных комплексах осетровых / Е. В. Серебрякова // Генетика, селекция и гибридизация рыб / под ред. Б. И. Черфаса. – Иерусалим: Keter Press Binding, 1972. – С. 98 – 106.

34. Сидорова, Л. И. Размерно-весовые характеристики ленской популяции сибирского осетра Acipenser baerii Brandt, 1869 / Л. И. Сидорова, А. Ф. Кириллов, М. М. Ксенофонтов // Научные труды Дальрыбвтуза. – 2024. – Т. 68, № 2. – С. 127–131. – doi:10.48612/dalrybvtuz/2024-68-14.

35. Система «Генэксперт Осетр». – Режим доступа: https://www.syntol.ru/catalog/reagenty-dlya-geneticheskikh-analizatorov/genekspert-osyetr.html (дата обращения: 06.02.2026).

36. Тимошкина, Н. Н. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра (Acipenser gueldenstaedtii) / Н. Н. Тимошкина, А. Е. Барминцева, А. В. Усатов, Н. С. Мюге // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 9. – С. 1250–1259.

37. Товарное осетроводство: учебное пособие для СПО / Е. И. Хрусталев, Т. М. Курапова, Э. В. Бубунец и др. – 2-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2022. – 300 с.

38. Филиппова, О. П. Морфометрическая характеристика гибрида русского осетра Acipenser gueldenstaedtii Брандт с ленским осетром Acipenser baerii Брандт / О. П. Филиппова // Культивирование морских организмов: сборник научных трудов. – Москва: ВНИРО, 1985. – С. 117–128.

39. Харзинова, В. Р. Характеристика генетической структуры аквакультурной и дикой популяций стерляди (Acipenser ruthenus Linnaeus, 1758) на основе анализа микросателлитов / В. Р. Харзинова, В. В. Волкова, В. И. Никипелов

и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2024. – Т. 59, № 4. – С. 666–679. – doi: 10.15389/agrobiology.2024.4.666rus.

40. Akbulut, B. Stimulating sturgeon conservation and rehabilitation measures in Turkey: an overview on major projects (2006–2009) / B. Akbulut, M. Zengin, Y. Ciftci, S. Ustaoglu Tiril, D. Memis, A. Alkan, E. Cakmak, I. Z. Kurtoglu, I. Aydin, E. Ustundag, O. Eroglu // Journal of Applied Ichthyology. – 2011. – Vol. 27, No. 2. – P. 415–419. – doi: 10.1111/j.1439-0426.2011.01736.x.

41. Anderson, E. C. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data / E. C. Anderson, E. A. Thompson // Genetics. – 2002. – Vol. 160, No. 3. – P. 1217–1229. – DOI 10.1093/genetics/160.3.1217.

42. Bauer, O. N. Study of parasite and diseases of sturgeons in Russia: a review / O. N. Bauer, O. V. Pugachev, V. N. Voronin // Journal of Applied Ichthyology. – 2002. – Vol. 18. – P. 420–429.

43. Billard, R. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish / R. Billard, G. Lecointre // Reviews in Fish Biology and Fisheries. – 2001. – Vol. 10. – P. 355–392.

44. Biltueva, L. S. Chromosome Distribution of Highly Conserved Tandemly Arranged Repetitive DNAs in the Siberian Sturgeon (Acipenser baerii) / L. S. Biltueva, D. Y. Prokopov, S. A. Romanenko, E. A. Interesova, M. Schartl, V. A. Trifonov // Genes. – 2020. – Vol. 11, No. 11. – P. 1375. – doi:10.3390/genes11111375.

45. Birstein, V. J. How many species are there within the genus Acipenser / V. J. Birstein, W. E. Bemis // Environmental Biology of Fishes. – 1997. – Vol. 48. – P. 157–163. – doi: 10.1023/A:1007354827093.

46. Birstein, V. J. Molecular phylogeny of Acipenseridae / V. J. Birstein, R. DeSalle // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 1998. – Vol. 5, No. 1. – P. 141–155.

47. Birstein, V. J. Molecular Phylogeny of Acipenseridae: Nonmonophyly of Scaphirhynchinae / V. J. Birstein, P. Doukakis, R. DeSalle // Copeia. – 2002. – Vol. 2002, No. 2. P. 287–301. doi: 10.1643/0045-8511(2002)002(0287:MPOANS)2.0.CO;2

48. Birstein, V. J. Phylogeny of Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches / V. J. Birstein, R. Hanner, R. DeSalle // Environmental Biology of Fishes. – 1997. – Vol. 48. – P. 127–155.

49. Birstein, V. J. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, Acipenser gueldenstaedtii: forensic and evolutionary implications / V. J. Birstein, P. Doukakis, R. DeSalle // Conservation Genetics. – 2000. – Vol. 1, No. 1. – P. 81–88.

50. Birstein, V. J. Sturgeons and paddlefishes: threatened fishes in need of conservation / V. J. Birstein // Conservation Biology. – 1993. – Vol. 7. – P. 773–786.

51. Birstein, V. J. Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes (Pisces): karyotypes, nucleoli, and nucleolus-organizer regions in four acipenserid species / V. J. Birstein, V. P. Vasil'ev // Genetica. – 1987. – Vol. 73. – P. 3–12.

52. Birstein, V. J. The enigmatic Caspian Sea Russian sturgeon: how many cryptic forms does it contain? / V. J. Birstein, G. Ruban, A. Ludwig, P. Doukakis, R. DeSalle // Systematics and Biodiversity. – 2005. – Vol. 3, No. 2. – P. 203–218.

53. Borrell, Y. Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in the Atlantic salmon, Salmo salar L. / Y. Borrell, H. Pineda, I. McCarthy et al. // Heredity. – 2004. – Vol. 92. – P. 585–593. – doi: 10.1038/sj.hdy.6800477.

54. Breve, N. W. The conservation paradox of critically endangered fish species: Trading alien sturgeons versus native sturgeon reintroduction in the Rhine-Meuse River delta / N. W. Breve, R. S. Leuven, A. D. Buijse, A. J. Murk, J. Venema, L. A. Nagelkerke // Science of the Total Environment. – 2022. – Vol. 848. – P. 157641. – doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157641.

55. Bronzi, P. A brief overview on the status and prospects of sturgeon farming in Western and Central Europe / P. Bronzi, H. Rosenthal, G. Arlati, P. Williot // Journal of Applied Ichthyology. – 1999. – Vol. 15, No. 4-5. – P. 224–227.

56. Bronzi, P. Global sturgeon aquaculture production: an overview / P. Bronzi, H. Rosenthal, J. Gessner // Journal of Applied Ichthyology. – 2011. – Vol. 27, No. 2. – P. 169–175. – doi: 10.1111/j.1439-0426.2011.01757.x

57. Bronzi, P. Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview / P. Bronzi, H. Rosenthal // Journal of Applied Ichthyology. – 2014. – Vol. 30. – P. 1536–1546. – doi: 10.1111/jai.12628.

58. Bronzi, P. Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017 / P. Bronzi, M. Chebanov, J. T. Michaels, Q. Wei, H. Rosenthal, J. Gessner // Journal of Applied Ichthyology. – 2019. – Vol. 35. – P. 257–266. – doi: 10.1111/jai.13870.

59. Chandra, G. Trends in aquaculture and conservation of sturgeons: a review of molecular and cytogenetic tools / G. Chandra, D. Fopp-Bayat // Reviews in Aquaculture. – 2021. – Vol. 13. – P. 119–137. – doi: 10.1111/raq.12466.

60. Clark, L. V. Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis / L. V. Clark, M. Jasieniuk // Molecular Ecology Resources. – 2011. – Vol. 11, No. 3. – P. 562–566. – doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x.

61. Dakin, E. E. Microsatellite null alleles in parentage analysis / E. E. Dakin, J. C. Avise // Heredity. – 2004. – Vol. 93, No. 5. – P. 504–509. – doi: 10.1038/sj.hdy.6800545.

62. Dingerkus, G. Karyotypic analysis and evidence of tetraploidy in the North American paddlefish, Polyodon spathula / G. Dingerkus, W. M. Howell // Science. – 1976. – Vol. 194. – P. 842–844.

63. Doveri, S. Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (Olea europaea L.) / S. Doveri, F. S. Gil, A. Diaz et al. // Scientia Horticulturae. – 2008. – Vol. 116, No. 4. – P. 367–373. – doi: 10.1016/j.scienta.2008.02.005.

64. Du, K. The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization / K. Du, M. Stock, S. Kneitz, C. Klopp, J. Woltering, M. C. Adolfi, R. Feron, D. Prokopov, A. Makunin, I. Kichigin et al. // Nature Ecology & Evolution. – 2020. – Vol. 4. – P. 841–852. – doi: 10.1038/s41559-020-1166-x.

65. Dudu, A. A Multistep DNA-Based Methodology for Accurate Authentication of Sturgeon Species / A. Dudu, M. Samu, M. Maereanu, S. E. Georgescu // Foods. – 2022. – Vol. 11. – P. 1007. – doi: 10.3390/foods11071007.

66. Dudu, A. Nuclear markers of Danube sturgeons hybridization / A. Dudu, R. Suciu, M. Paraschiv, S. E. Georgescu, M. Costache, P. Berrebi // International Journal of Molecular Sciences. – 2011. – Vol. 12. – P. 6796–6809. – doi: 10.3390/ijms12106796.

67. Ellegren, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution / H. Ellegren // Nature Reviews Genetics. – 2004. – Vol. 5. – P. 435–445.

68. Elhetawy, A. I. G. Sturgeon aquaculture potentiality in Egypt in view of the global development of aquaculture and fisheries conservation techniques: an overview and outlook / A. I. G. Elhetawy, L. M. Vasilyeva, N. V. Sudakova, M. M. Abdel-Rahim // Aquatic Sciences and Engineering. – 2023. – Vol. 38, No. 4. – P. 222–231. – doi: 10.26650/A/SE20231277641.

69. Ellis, J. S. Microsatellite standardization and evaluation of genotyping error in a large multi-partner research programme for conservation of Atlantic salmon (Salmo salar L.) / J. S. Ellis, J. Gilbey, A. Armstrong et al. // Genetica. – 2011. – Vol. 139, No. 3. – P. 353–367. – doi: 10.1007/s10709-011-9554-4.

70. Esselink, G. D. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting – peak ratios) method / G. D. Esselink, H. Nybom, B. Vosman // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – Vol. 109. – P. 402–408. – doi: 10.1007/s00122-004-1645-5.

71. Flajshans, M. Odd ploidy levels in sturgeon suggest a backcross of interspecific hexaploid sturgeon hybrids to evolutionary tetraploid and/or octaploid parental species / M. Flajshans, V. Vajcova // Folia Zoologica. – 2000. – Vol. 49. – P. 133–138.

72. Fontana, F. A cytogenetic approach to the study of taxonomy and evolution in sturgeons / F. Fontana // Journal of Applied Ichthyology. – 2002. – Vol. 18. – P. 226–233. – doi: 10.1046/j.1439-0426.2002.00360.x.

73. Fontana, F. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces) / F. Fontana // Genome. – 1994. – Vol. 37. – P. 888–892.

74. Fontana, F. Evidence of hexaploid karyotype in shortnose sturgeon / F. Fontana, L. Congiu, V. A. Mudrak, J. M. Quattro, T. I. J. Smith, K. Ware, S. I. Doroshov // Genome. – 2008. – Vol. 51. – P. 113–119.

75. Fontana, F. Polyploidy in Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches / F. Fontana et al. // Fish Cytogenetics. – 2007. – Vol. 385. – P. 403.

76. Fopp-Bayat, D. Microsatellite DNA variation in the Siberian sturgeon, Acipenser baeri (Actinopterygii, Acipenseriformes, Acipenseridae), cultured in a Polish fish farm / D. Fopp-Bayat // Acta Ichthyologica et Piscatoria. – 2010. – Vol. 40, No. 1. – P. 21–25.

77. Fopp-Bayat, D. Verification of ploidy level in sturgeon larvae / D. Fopp-Bayat, P. Woznicki // Aquaculture Research. – 2006. – Vol. 37, No. 16. – P. 1671–1675. – DOI 10.1111/j.1365-2109.2006.01614.x.

78. Forlani, A. Isolation of microsatellite loci from the endemic and endangered Adriatic sturgeon (Acipenser naccarii) / A. Forlani, F. Fontana, L. Congiu // Conservation Genetics. – 2008. – Vol. 9. – P. 461–463.

79. Francis, R. M. Pophelper: an R package and web app to analyse and visualize population structure / R. M. Francis // Mol Ecol Resour. – 2017. – Vol. 17. – P. 27-32. – DOI https://doi.org/10.1111/1755-0998.12509.

80. Garcia-Hermoso, D. Multicenter collaborative study for standardization of Candida albicans genotyping using a polymorphic microsatellite marker / D. Garcia-Hermoso, D. M. MacCallum, T. J. Lott et al. // Journal of Clinical Microbiology. – 2010. – Vol. 48, No. 7. – P. 2578–2581. – DOI 10.1128/JCM.00040-10.

81. Garcia-Verdugo, C. Polyploidy and microsatellite variation in the relict tree Prunus lusitanica L.: how effective are refugia in preserving genotypic diversity of clonal taxa? / C. Garcia-Verdugo, J. A. Calleja, P. Vargas, L. Silva, O. Moreira, F. Pulido // Molecular Ecology. – 2013. – Vol. 22, No. 6. – P. 1546–1557. – DOI 10.1111/mec.12194.

82. Georgescu, S. Analysis of the microsatellite variation in the common hybrid between Russian sturgeon (Acipenser gueldenstaedtii Brandt and Ratzeburg, 1833) and Siberian sturgeon (Acipenser baerii Brandt, 1869) from aquaculture / S. Georgescu, O. Canareica, A. Dudu, M. Costache // Transylvanian Review of Systematical & Ecological Research. – 2013. – Vol. 15, No. 2.

83. Guichoux, E. Current trends in microsatellite genotyping / E. Guichoux, L. Lagache, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Leger, O. Lepais, C. Lepoittevin, T. Malausa, E. Revardel, F. Salin, R. J. Petit // Molecular Ecology Resources. – 2011. – Vol. 11, No. 4. – P. 591–611. – DOI 10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x.

84. Han, M. Clonal growth characteristics and diversity patterns of different Clintonia udensis (Liliaceae) diploid and tetraploid cytotypes in the Hualongshan Mountains / M. Han, Q. Qie, M. Liu, H. Meng, T. Wu, Y. Yang, L. Niu, G. Sun, Y. Wang // Scientific Reports. – 2024. – Vol. 14, No. 1. – P. 15509. – DOI 10.1038/s41598-024-66067-0.

85. Hardy, O. SPAGeDI: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels / O. Hardy, X. Vekemans // Molecular Ecology Notes. – 2002. – Vol. 2, No. 4. – P. 618–620. – DOI 10.1046/j.1471-8286.2002.00305.x.

86. Harris, L. Understanding the global caviar market. Result of a rapid assessment of trade in sturgeon caviar / L. Harris, H. Shiraishi. – TRAFFIC and WWF joint report, 2018. – 94 p.

87. Hassanzadeh Saber, M. Study of sex determination system in ship sturgeon, Acipenser nudiventris using meiotic gynogenesis / M. Hassanzadeh Saber, A. Hallajian // Aquaculture International. – 2014. – Vol. 22, No. 1. – P. 273–279.

88. Havelka, M. Extensive genome duplications in sturgeons: New evidence from microsatellite data / M. Havelka, M. Hulák, D. A. Bailie, P. A. Prodohl, M. Flajshans // Journal of Applied Ichthyology. – 2013. – Vol. 29. – P. 704–708. – DOI 10.1111/jai.12224.

89. Havelka, M. Fertility of a spontaneous hexaploid male Siberian sturgeon, Acipenser baerii / M. Havelka, M. Hulák, P. Rab, M. Rabova, D. Lieckfeldt, A. Ludwig, M. Rodina, D. Gela, M. Psenicka, D. Bytyutskyy, M. Flajshans // BMC Genetics. – 2014. – Vol. 15. – P. 5. – DOI 10.1186/1471-2156-15-5.

90. Havelka, M. The second highest chromosome count among vertebrates is observed in cultured sturgeon and is associated with genome plasticity / M. Havelka, D. Bytyutskyy, R. Symonova, P. Rab, M. Flajshans // Genetics Selection Evolution. – 2016. – Vol. 48. – P. 1–9. – DOI 10.1186/s12711-016-0194-0.

91. Henderson-Arzapalo, A. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (Acipenser oxyrinchus) population delineation and broodstock management / A.

Henderson-Arzapalo, T. L. King // Molecular Ecology Notes. – 2002. – Vol. 2. – P. 437–439. – DOI 10.1046/j.1471-8286.2002.00262.x.

92. Hewitt, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages / G. Hewitt // Nature. – 2000. – Vol. 405. – P. 907–913. – DOI 10.1038/35016000.

93. Hilton, E. J. Observations on the skulls of sturgeons (Acipenseridae): shared similarities of Pseudoscaphirhynchus kaufmanni and juvenile specimens of Acipenser stellatus / E. J. Hilton // Environmental Biology of Fishes. – 2005. – Vol. 72, No. 2. – P. 135–144.

94. Hilton, E. J. Review of the fossil record of sturgeons, family Acipenseridae (Actinopterygii: Acipenseriformes), from North America / E. J. Hilton, L. Grande // Journal of Paleontology. – 2006. – Vol. 80. – P. 672–683.

95. Hubisz, M. J. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information / M. J. Hubisz, D. Falush, M. Stephens, J. K. Pritchard // Molecular Ecology Resources. – 2009. – Vol. 9, No. 5. – P. 1322–1332. – DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x.

96. Huson, D. H. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies / D. H. Huson, D. Bryant // Molecular Biology and Evolution. – 2006. – Vol. 23, No. 2. – P. 254–267. – DOI 10.1093/molbev/msj030.

97. Huvier, N. Time is running out: Microsatellite data predict the imminent extinction of the boreal lynx (Lynx lynx) in France / N. Huvier, G. Moyne, C. Kaerle, L. Mouzon-Moyne // Frontiers in Conservation Science. – 2023. – Vol. 4. – P. 1080561. – DOI 10.3389/fcosc.2023.1080561.

98. Jenneckens, I. Evidence of mitochondrial DNA clones of Siberian sturgeon, Acipenser baerii, within Russian sturgeon, Acipenser gueldenstaedtii, caught in the River Volga / I. Jenneckens, J.-N. Meyer, L. Debus, C. Pitra, A. Ludwig // Ecology Letters. – 2000. – Vol. 3, No. 6. – P. 503–508.

99. Kalia, R. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants / R. K. Kalia, M. K. Rai, S. Kalia et al. // Euphytica. – 2011. – Vol. 177. – P. 309–334. – DOI 10.1007/s10681-010-0286-9.

100. Kim, K.-R. Assessment of the Genetic Diversity and Structure of the Korean Endemic Freshwater Fish Microphysogobio longidorsalis (Gobioninae) Using Microsatellite Markers / K.-R. Kim, M. S. Sung, Y. Hwang, J. H. Jeong, J. N. Yu // Genes. – 2024. – Vol. 15. – P. 69. – DOI 10.3390/genes15010069.

101. King, T. L. Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (Acipenser oxyrinchus oxyrinchus) and cross-species amplification in the Acipenseridae / T. L. King, B. A. Lubinski, A. P. Spidle // Conservation Genetics. – 2001. – Vol. 2. – P. 103 – 119.

102. Kohlmann, K. New microsatellite multiplex PCR sets for genetic studies of the sterlet sturgeon, Acipenser ruthenus / K. Kohlmann, P. Kersten, J.Gessner, D. Onara, E. Taflan, S. Radu // Environmental Biotechnology. – 2017. – Vol. 13, No. 1. – P. 11–17.

103. Kolman, R. Food Characteristics and Feeding Management on Sturgeon with a Special Focus on the Siberian Sturgeon / R. Kolman, A. Kapusta // The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 2 – Farming / eds. P. Williot, G. Nonnotte, M. Chebanov. – Cham: Springer, 2018. – DOI 10.1007/978-3-319-61676-6_5.

104. Krieger, J. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited / J. Krieger, A. K. Hett, P. A. Fuerst, E. Artyukhin, A. Ludwig // Journal of Applied Ichthyology. – 2008. – Vol. 24. – P. 36–45.

105. Landergott, U. Allelic configuration and polysomic inheritance of highly variable microsatellites in tetraploid gynodioecious Thymus praecox agg. / U. Landergott, Y. Naciri, J. J. Schneller et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – Vol. 113. – P. 453–465. – DOI 10.1007/s00122-006-0310-6.

106. Li, Y. C. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review / Y. C. Li, A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, E. Nevo // Molecular Ecology. – 2002. – Vol. 11. – P. 2453–2465.

107. Ludwig, A. First evidence of hybridization between endangered sterlets (Acipenser ruthenus) and exotic Siberian sturgeons (Acipenser baerii) in the Danube River / A. Ludwig, S. Lippold, L. Debus, R. Reinartz // Biological Invasions. – 2009. – Vol. 11. – P. 753 – 760. – DOI 10.1007/s10530-008-9289-z.

108. Ludwig, A. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus) / A. Ludwig, N. M. Belfiore, C. Pitra, V. Svirsky, I. Jenneckens // Genetics. – 2001. – Vol. 158, No. 3. – P. 1203–1215.

109. Luttikhuizen, P. C. Genetic diversity in diploid vs. tetraploid Rorippa amphibia (Brassicaceae) / P. C. Luttikhuizen, M. Stift, P. Kuperus, P. H. Van Tienderen // Molecular Ecology. – 2007. – Vol. 16. – P. 3544–3553. – DOI 10.1111/j.1365-294X.2007.03411.x.

110. Lyu, D. Inbreeding evaluation using microsatellite confirmed inbreeding depression in growth in the Fenneropenaeus chinensis natural population / D. Lyu, S. Sun, X. Shan, W. Wang // Frontiers in Genetics. – 2023. – Vol. 14. – P. 1077814. – DOI 10.3389/fgene.2023.1077814.

111. Mayden, R. L. Systematics, taxonomy, and conservation status of the endangered Alabama sturgeon, Scaphirhynchus suttkusi Williams and Clemmer (Actinopterygii, Acipenseridae) / R. L. Mayden, B. R. Kuhajda // Copeia. – 1996. – P. 241–273.

112. McQuown, E. C. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: new primer sequences for Scaphirhynchus and Acipenser / E. C. McQuown, B. L. Sloss, R. J. Sheehan, J. Rodzen, G. Tranah, B. May // Transactions of the American Fisheries Society. – 2000. – Vol. 129, No. 6. – P. 1380–1388.

113. Moghim, M. Nuclear Multi-Microsatellite Marker Profiling Provides Clues to Molecular Genetic Diversity in Culture-Based Caspian Beluga Sturgeon (Huso huso) Brood Stocks: Ecological Mirror for Restoration / M. Moghim, A. Javanmard, F. Lolaei, M. J. Taghavi, S. Bakhshalizadeh // Veterinary Medicine and Science. – 2025. – Vol. 11, No. 3. – P. e70255. – DOI 10.1002/vms3.70255.

114. Mugue, N. S. Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in eight sturgeon species and development of a system for DNA-based species identification / N. S. Mugue, A. E. Barmintseva, S. M. Rastorguev, V. N. Mugue, V. A. Barmintsev // Russian Journal of Genetics. – 2008. – Vol. 44. No. 7. – P. 793–798.

115. Nelson, J. S. Fishes of the world / J. S. Nelson. – 3rd ed. – New York: John Wiley and Sons, 1994.

116. Norouzi, M. Genetic structure of Caspian populations of stellate sturgeon, Acipenser stellatus (Pallas, 1771), using microsatellite markers / M. Norouzi, M. Pourkazemi // International Aquatic Research. – 2009. – Vol. 1. – P. 61– 65.

117. Ohno, S. Evolution by gene duplication / S. Ohno. – Berlin: Springer, 1970.

118. Ohno, S. Microchromosomes in holocephalian, chondrostean and holostean fishes / S. Ohno, J. Muramoto, C. Stenius, L. Christian, W. A. Kitterell // Chromosoma. – 1969. – Vol. 226. – P. 35–40.

119. Panagiotopoulou, H. Microsatellite multiplex assay for the analysis of Atlantic sturgeon populations / H. Panagiotopoulou, D. Popovic, K. Zalewska, P. Weglenski, A. Stankovic // Journal of Applied Genetics. – 2014. – Vol. 55, No. 4. – P. 505–510. – DOI 10.1007/s13353-014-0216-y.

120. Parisod, C. Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in Spartina / C. Parisod, A. Salmon, T. Zerjal, M. Tenaillon, M.-A. Grandbastien, M. Ainouche // New Phytologist. – 2009. – Vol. 184. – P. 1003–1015. – DOI 10.1111/j.1469-8137.2009.03029.x.

121. Peng, Z. Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes) / Z. Peng, A. Ludwig, D. Wang, R. Diogo, Q. Wei, S. He // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2007. – Vol. 42. – P. 854–862.

122. Pogson, G. H. DNA heterozygosity and growth rate in the Atlantic cod Gadus morhua (L) / G. H. Pogson, S. E. Fevolden // Evolution. – 1998. Vol. 52. – P. 915–920. DOI https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb03717.x.

123. Pogson, G. H. Isolation by distance in the Atlantic cod, Gadus morhua, at large and small geographic scales / G. H. Pogson, C. T. Taggart, K. A. Mesa, R. G. Boutilier // Evolution. – 2001. – Vol. 55, No. 1. – P.131-46. DOI 10.1111/j.0014-3820.2001.tb01279.x.

124. Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // Genetics. – 2000. – Vol. 155. – P. 945–959. – DOI 10.1093/genetics/155.2.945.

125. Prokes, M. Growth of sterlet (Acipenser ruthenus) under experimental and farm conditions of the Czech Republic, with remarks on other sturgeons / M. Prokes, V.

Barus, J. Mares, M. Penaz, V. Baránek // Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. – 2011. – Vol. LIX. – P. 281–290. – DOI 10.11118/actaun201159060281.

126. Pyatskowit, J. D. Inheritance of microsatellite loci in the polyploid derivative lake sturgeon (Acipenser fulvescens) / J. D. Pyatskowit, C. C. Krueger, H. L. Kincaid, B. May // Genome. – 2001. – Vol. 44. – P. 185–191.

127. Rajkov, J. Evolution of Polyploidy and Functional Diploidization in Sturgeons: Microsatellite Analysis in 10 Sturgeon Species / J. Rajkov, Z. Shao, P. Berrebi // Journal of Heredity. – 2014. – Vol. 105, No. 4. – P. 521–531. – DOI 10.1093/jhered/esu027.

128. Rathmacher, G. Allelic ladders and reference genotypes for a rigorous standardization of poplar microsatellite data / G. Rathmacher, M. Niggemann, H. Wypukol, K. A. Gebhardt, B. Ziegenhagen, R. Bialozyt // Trees. – 2009. – Vol. 23, No. 3. – P. 573–583. – DOI 10.1007/s00468-008-0302-z.

129. Ruban, G. I. On the species structure of the Siberian sturgeon Acipenser baerii Brandt (Acipenseridae) / G. I. Ruban // Journal of Ichthyology. – 1998. – Vol. 38, No. 5. – P. 345–365.

130. Ruban, G. I. Species structure, contemporary distribution and status of the Siberian sturgeon, Acipenser baerii / G. I. Ruban // Environmental Biology of Fishes. – 1997. – Vol. 48. No. 1-4. – P. 221–230. – DOI 10.1023/a: 1007372932444.

131. Ruban, G. I. The Siberian sturgeon Acipenser baerii Brandt. Species structure and ecology / G. I. Ruban. – Norderstedt: World Sturgeon Conservation Society, 2005. – Special Publication No 1. – 203 p.

132. Ryabova, G. D. Analysis of allozyme diversity in stellate sturgeon Acipenser stellatus (Pallas) from the Northern Caspian / G. D. Ryabova, I. G. Kutergina // Genetika. – 1990. – Vol. 26. – P. 902–911.

133. Saltonstall, K. Microsatellite variation within and among North American lineages of Phragmites australis / K. Saltonstall // Molecular Ecology. – 2003. – Vol. 12. – P. 1689–1702. – DOI 10.1046/j.1365-294X.2003.01849.x.

134. Schreier, A. D. Genetic techniques inform conservation aquaculture of the endangered Kootenai River white sturgeon Acipenser transmontanus / A. D. Schreier, J. Rodzen, S. Ireland, B. May // Endangered Species Research. – 2012. – Vol. 16. – P. 65–75. – DOI 10.3354/esr00387.

135. Schreier, A. D. Neutral markers confirm the octoploid origin and reveal spontaneous autopolyploidy in white sturgeon, Acipenser transmontanus / A. D. Schreier, D. Gille, B. Mahardja, B. May // Journal of Applied Ichthyology. – 2011. – Vol. 27. – P. 24–33. – DOI 10.1111/j.1439-0426.2011.01873.x.

136. Shivaramu, S. Influence of interspecific hybridization on fitness-related traits in Siberian sturgeon and Russian sturgeon / S. Shivaramu, D. T. Vuong, M. Havelka, H. Sachlova, I. Lebeda, V. Kaspar, M. Flajshans // Czech Journal of Animal Science. – 2019. – Vol. 64, No. 2. – P. 78–88. – DOI 10.17221/165/2018-CJAS.

137. Shivaramu, S. Ploidy Levels and Fitness-Related Traits in Purebreds and Hybrids Originating from Sterlet (Acipenser ruthenus) and Unusual Ploidy Levels of Siberian Sturgeon (A. baerii) / S. Shivaramu, I. Lebeda, D. T. Vuong et al. // Genes. – 2020. – Vol. 11, No. 10. – P. 1164. – DOI 10.3390/genes11101164.

138. Stephenson, J. J. A centralized model for creating shared, standardized, microsatellite data that simplifies inter-laboratory collaboration / J. J. Stephenson, M. R. Campbell, J. E. Hess et al. // Conservation Genetics. – 2009. – Vol. 10, No. 4. – P. 1145–1149. – DOI 10.1007/s10592-008-9729-4.

139. Sunnucks, P. Efficient genetic markers for population biology / P. Sunnucks // Trends in Ecology & Evolution. – 2000. – Vol. 15. – P. 199–203.

140. Taylor, M. I. Microsatellites reveal high levels of population substructuring in the species-poor Eretmodine cichlid lineage from Lake Tanganyika / M. I. Taylor, L. Ruber, E. Verheyen // Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. – 2001. – Vol. 268, No. 1469. – P. 803–808.

141. Tiril, S. U. An overview of the factors affecting the migration of sturgeons in Yeşilırmak / S. U. Tiril, D. Memis // Aquatic Sciences and Engineering. – 2018. – Vol. 33, No. 4. – P. 138–144. – DOI 10.26650/ASE20180002.

142. Toth, G. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis / G. Toth, Z. Gaspari, J. Jurka // Genome Research. – 2000. – Vol. 10. No. 7. – P. 967–981. – DOI 10.1101/gr.10.7.967.

143. Tranah, G. Genetic evidence for hybridization of pallid and shovelnose sturgeon / G. Tranah, D. E. Campton, B. May // Journal of Heredity. – 2004. – Vol. 95. – P. 474–480. – DOI 10.1093/jhered/esh077.

144. Vasil'ev, V. P. Karyological study in backcross hybrids between the sterlet, Acipenser ruthenus, and kaluga, A. dauricus (Actinopterygii: Acipenseriformes: Acipenseridae): A. ruthenus× (A. ruthenus×A. dauricus) and A. dauricus× (A. ruthenus×A. dauricus) / V. P. Vasil'ev et al. // Acta Ichthyologica et Piscatoria. – 2014. – Vol. 44. – P. 301–308.

145. Vasil'ev, V. P. Ploidy levels in the kaluga Huso dauricus and Sakhalin sturgeon Acipenser mikadoi (Acipenseridae, Pisces) / V. P. Vasil'ev, E. D. Vasil'eva, S. V. Shedko, G. V. Novomodny // Doklady Biological Sciences. – 2009. – Vol. 426. – P. 228–231.

146. Vasilyeva, L. M. History, current status and prospects of sturgeon aquaculture in Russia / L. M. Vasilyeva, A. I. G. Elhetawy, N. V. Sudakova, S. S. Astafyeva // Aquaculture Research. – 2019. – Vol. 50. – P. 979–993. – DOI 10.1111/are.13997.

147. Vergilino, R. Genome size evolution and polyploidy in the Daphnia pulex complex (Cladocera: Daphniidae) / R. Vergilino, C. Belzile, F. Dufresne // Biological Journal of the Linnean Society. – 2009. – Vol. 97. – P. 68–79. – DOI 10.1111/j.1095-8312.2008.01185.x.

148. Wang, J. Developing microsatellite duplex PCR reactions for sterlet (Acipenser ruthenus) and their application in parentage identification / J. Wang, Z. Sun, L. Jiang, Y. Hu // Scientific Reports. – 2022. – Vol. 12. – P. 12036. – DOI 10.1038/s41598-022-16194-3.

149. Ward, R. D. Population structure of the Patagonian toothfish (Dissostichus eleginoides) in Australian waters / R. D. Ward, S. A. Appleyard, R. Williams. – CSIRO Division of Marine Research, 2002.

150. Wei, Q. Sturgeon aquaculture in China: progress, strategies and prospects assessed on the basis of nation-wide surveys (2007–2009) / Q. Wei, Y. Zou, P. Li, L. Li // Journal of Applied Ichthyology. – 2011. – Vol. 27. – P. 162–168.

151. Welsh, A. B. Development and standardization of disomic microsatellite loci for lake sturgeon genetic studies / A. B. Welsh, B. May // Journal of Applied Ichthyology. – 2006. – Vol. 22. – P. 337–344.

152. Welsh, A. B. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, Acipenser fulvescens, and their variability in green sturgeon, A. medirostris / A. B. Welsh, M. Blumberg, B. May // Molecular Ecology Notes. – 2003. – Vol. 3. – P. 47–55.

153. Williot, P. The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii Brandt, 1869) Volume 1 – Biology / P. Williot, G. Nonnotte, D. Vizziano, M. Chebanov. – Springer International Publishing, 2018. – DOI 10.1007/978-3-319-61664-3.

154. Yang, S. Identification of Hybrid Sturgeon (Acipenser baerii × Acipenser schrenckii) from Their Parents Using Germplasm / S. Yang, Z. Zhao, Z. Xu, Y. Liu, M. Jiang, L. Fu, J. Zhang, Z. Jing, X. Pang, W. Shao, C. Zhang, Y. Li, X. Du, J. Wu // Animals. – 2025. – Vol. 15. No. 7. – P. 907. – DOI 10.3390/ani15070907.

155. Zane, L. Strategies for microsatellite isolation: a review / L. Zane, L. Bargelloni, T. Patarnello // Molecular Ecology. – 2002. – Vol. 11. – P. 1–16.

156. Zhang, X. Genetic variation and relationships of seven sturgeon species and ten interspecific hybrids / X. Zhang, W. Wu, L. Li, X. Ma, J. Chen // Genetics Selection Evolution. – 2013. – Vol. 45. – P. 21. – DOI 10.1186/1297-9686-45-21.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Agu38* в исследованных группах осетровых

Agu38	**94**	**106**	**108**	**110**	**112**	**114**	**116**	**120**	**122**
Общий	0,001	0,001	0,364	0,114	0,241	0,153	0,018	0,002	0,053
ABAE	0,003	0,000	0,486	0,164	0,120	0,219	0,008	0,000	0,000
ASCH	0,000	0,021	0,292	0,219	0,115	0,000	0,000	0,000	0,000
AGUE	0,000	0,000	0,474	0,269	0,026	0,218	0,013	0,000	0,000
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,525	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,150	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000
HUS	0,000	0,000	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,977
ASTEL	0,000	0,000	0,081	0,000	0,801	0,118	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,000	0,083	0,000	0,167	0,750	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,604	0,000	0,354	0,042	0,000	0,000	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Agu38* в исследованных группах осетровых

Agu38	**124**	**126**	**128**	**130**	**132**	**134**	**136**	**138**
Общий	0,002	0,008	0,012	0,001	0,009	0,006	0,005	0,009
ABAE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASCH	0,000	0,000	0,000	0,010	0,063	0,094	0,063	0,125
AGUE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AMIK	0,000	0,000	0,275	0,000	0,150	0,000	0,000	0,050
HDAU	0,075	0,325	0,200	0,025	0,075	0,000	0,050	0,000
HUS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *An20* в исследованных группах осетровых

An20	**123**	**125**	**131**	**135**	**137**	**139**	**143**	**145**	**147**	**149**	**152**	**153**	**157**
Общий	0,008	0,002	0,026	0,108	0,017	0,039	0,052	0,014	0,013	0,005	0,071	0,116	0,098
ABAE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,023	0,000	0,028	0,000	0,000	0,140	0,162	0,195
ASCH	0,115	0,021	0,292	0,000	0,021	0,031	0,094	0,010	0,094	0,063	0,083	0,000	0,031
AGUE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,006	0,000	0,013	0,019	0,006	0,058
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,175
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,375	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,025
HUS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,295	0,000	0,682	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,007	0,007	0,051	0,640	0,000	0,154	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,417	0,000	0,042	0,000	0,042
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,375	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *An20* в исследованных группах осетровых

An20	**160**	**161**	**164**	**165**	**167**	**169**	**173**	**175**	**177**	**179**	**182**	**191**
Общий	0,071	0,036	0,131	0,030	0,001	0,056	0,059	0,001	0,032	0,005	0,006	0,005
ABAE	0,079	0,069	0,213	0,052	0,000	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000
ASCH	0,052	0,000	0,094	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AGUE	0,244	0,000	0,167	0,000	0,000	0,455	0,013	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,575	0,150	0,000	0,100
HDAU	0,000	0,225	0,000	0,275	0,025	0,000	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HUS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,000	0,000	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,103	0,007	0,000	0,000
ANUD	0,458	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,021	0,000	0,083	0,000	0,000	0,010	0,469	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Aru18* в исследованных группах осетровых

Aru 18	**131**	**137**	**139**	**143**	**145**
Общий	0,051	0,519	0,239	0,155	0,037
ABAE	0,000	0,833	0,076	0,059	0,031
ASCH	0,000	0,948	0,052	0,000	0,000
AGUE	0,013	0,917	0,026	0,026	0,019
AMIK	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,250	0,675	0,075	0,000
HUS	0,000	0,000	0,977	0,023	0,000
ASTEL	0,294	0,007	0,625	0,074	0,000
ANUD	0,000	0,083	0,000	0,917	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,823	0,177

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *As043* в исследованных группах осетровых

As043	**194**	**204**	**206**	**208**	**216**	**220**	**224**	**226**	**230**	**234**	**240**	**242**
Общий	0,025	0,004	0,024	0,001	0,001	0,008	0,001	0,001	0,038	0,053	0,024	0,075
ABAE	0,051	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,004	0,000	0,097
ASCH	0,042	0,000	0,000	0,010	0,000	0,115	0,000	0,000	0,031	0,000	0,052	0,021
AGUE	0,000	0,000	0,006	0,000	0,006	0,000	0,006	0,013	0,071	0,083	0,051	0,006
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,150	0,000	0,050
HUS	0,000	0,000	0,432	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,159	0,000	0,000	0,068
ASTEL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,132	0,096	0,103
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042
ARUT	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,167	0,146	0,000	0,063

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *As043* в исследованных группах осетровых

As043	**246**	**250**	**252**	**254**	**256**	**258**	**262**	**264**	**268**	**270**	**272**	**274**
Общий	0,048	0,105	0,004	0,067	0,007	0,078	0,124	0,032	0,095	0,072	0,006	0,054
ABAE	0,000	0,112	0,008	0,064	0,017	0,092	0,209	0,000	0,138	0,124	0,000	0,082
ASCH	0,031	0,063	0,000	0,052	0,000	0,125	0,073	0,000	0,052	0,000	0,000	0,125
AGUE	0,051	0,045	0,000	0,199	0,000	0,090	0,064	0,006	0,186	0,064	0,006	0,038
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,125	0,000	0,050	0,000	0,075	0,150	0,000	0,075	0,050	0,000	0,000
HUS	0,000	0,341	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,154	0,103	0,000	0,037	0,000	0,029	0,044	0,184	0,059	0,015	0,029	0,000
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,167	0,000	0,000	0,125	0,042	0,000	0,000
ARUT	0,125	0,073	0,000	0,052	0,000	0,104	0,094	0,000	0,000	0,010	0,000	0,063

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *As043* в исследованных группах осетровых

As043	**278**	**280**	**282**	**284**	**286**	**288**	**292**	**304**	**308**	**320**
Общий	0,002	0,014	0,001	0,015	0,002	0,012	0,003	0,001	0,001	0,003
ABAE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASCH	0,021	0,073	0,010	0,021	0,010	0,031	0,042	0,000	0,000	0,000
AGUE	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AMIK	0,000	0,300	0,000	0,325	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,075	0,000	0,000	0,025	0,025	0,025	0,125
HUS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,007	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,083	0,000	0,292	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Ls19* в исследованных группах осетровых

Ls 19	**113**	**115**	**119**	**123**	**125**	**127**	**129**	**131**	**133**	**135**
Общий	0,002	0,006	0,002	0,039	0,030	0,009	0,025	0,001	0,037	0,213
ABAE	0,000	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,251
ASCH	0,031	0,021	0,031	0,156	0,292	0,146	0,010	0,010	0,000	0,156
AGUE	0,000	0,000	0,000	0,019	0,051	0,000	0,000	0,000	0,218	0,096
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,200	0,025	0,450	0,075	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HUS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,044	0,478
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,417	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Ls19* в исследованных группах осетровых

Ls 19	**137**	**139**	**141**	**143**	**147**	**149**	**151**	**153**	**155**	**157**
Общий	0,013	0,396	0,170	0,006	0,038	0,001	0,004	0,001	0,003	0,004
ABAE	0,000	0,558	0,141	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASCH	0,104	0,021	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AGUE	0,071	0,147	0,103	0,006	0,179	0,013	0,019	0,006	0,032	0,038
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,200	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HUS	0,000	0,023	0,545	0,000	0,386	0,000	0,045	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,000	0,206	0,243	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,792	0,208	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Ag49a* в исследованных группах осетровых

Ag 49a	**186**	**192**	**194**	**196**	**198**	**200**	**202**	**204**	**206**	**208**	**210**	**214**	**216**
Общий	0,027	0,144	0,005	0,168	0,009	0,004	0,355	0,011	0,052	0,095	0,033	0,030	0,005
ABAE	0,000	0,233	0,010	0,058	0,000	0,000	0,576	0,000	0,105	0,000	0,000	0,000	0,000
ASCH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,469	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AGUE	0,000	0,006	0,000	0,090	0,090	0,038	0,654	0,051	0,064	0,000	0,006	0,000	0,000
AMIK	0,000	0,475	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,100	0,000	0,200
HDAU	0,000	0,000	0,025	0,200	0,000	0,000	0,375	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HUS	0,500	0,477	0,000	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,566	0,176	0,176	0,000
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,833	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,031	0,000	0,969	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Ag49a* в исследованных группах осетровых

Ag 49a	**218**	**220**	**224**	**226**	**230**	**232**	**236**	**238**	**242**	**246**	**248**	**252**
Общий	0,015	0,005	0,004	0,007	0,004	0,011	0,007	0,001	0,001	0,001	0,004	0,004
ABAE	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASCH	0,052	0,073	0,031	0,115	0,063	0,063	0,031	0,010	0,010	0,000	0,042	0,021
AGUE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AMIK	0,000	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,025	0,075	0,100
HUS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,022	0,000	0,015	0,000	0,000	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Agu37* в исследованных группах осетровых

Agu37	**114**	**116**	**120**	**122**	**124**	**126**	**128**	**130**	**132**	**134**
Общий	0,002	0,027	0,017	0,053	0,150	0,368	0,317	0,060	0,004	0,002
ABAE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,072	0,527	0,319	0,078	0,004	0,000
ASCH	0,031	0,000	0,260	0,313	0,042	0,240	0,115	0,000	0,000	0,000
AGUE	0,000	0,000	0,000	0,006	0,481	0,378	0,058	0,051	0,026	0,000
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,900	0,000	0,075	0,025	0,000	0,000	0,000
HUS	0,000	0,500	0,000	0,205	0,000	0,295	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,257	0,390	0,353	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,167	0,500	0,250	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,823	0,146	0,000	0,021

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Agu41* в исследованных группах осетровых

Agu41	**149**	**167**	**169**	**171**	**175**	**177**	**179**	**181**	**183**	**185**	**187**
Общий	0,002	0,006	0,012	0,002	0,002	0,103	0,083	0,084	0,050	0,096	0,030
ABAE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,141	0,045	0,078	0,000	0,020	0,000
ASCH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,073	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083
AGUE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,372	0,103	0,218	0,026	0,071	0,045
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,275	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,050	0,475	0,075	0,000	0,050	0,000	0,050	0,000	0,100	0,025
HUS	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,909	0,000	0,000	0,023	0,000
ASTEL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,044	0,279	0,404	0,110
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,875	0,000	0,000	0,083
ARUT	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,073	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Agu41* в исследованных группах осетровых

Agu41	**189**	**191**	**193**	**195**	**197**	**199**	**201**	**203**	**209**	**211**
Общий	0,185	0,140	0,087	0,013	0,041	0,012	0,045	0,002	0,001	0,002
ABAE	0,298	0,195	0,071	0,000	0,056	0,001	0,095	0,000	0,000	0,000
ASCH	0,271	0,042	0,000	0,063	0,146	0,198	0,021	0,042	0,021	0,042
AGUE	0,045	0,032	0,038	0,000	0,006	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000
AMIK	0,000	0,000	0,150	0,375	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,075	0,025	0,075	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HUS	0,000	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,162	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,042	0,396	0,396	0,000	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *AcR13V* в исследованных группах осетровых

AcR13V	**97**	**103**	**107**	**109**	**111**	**115**	**117**	**121**	**123**
Общий	0,034	0,001	0,094	0,049	0,025	0,017	0,052	0,040	0,157
ABAE	0,000	0,000	0,185	0,081	0,000	0,000	0,000	0,000	0,260
ASCH	0,542	0,010	0,021	0,000	0,000	0,094	0,021	0,177	0,094
AGUE	0,000	0,000	0,051	0,000	0,000	0,000	0,244	0,263	0,006
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,075	0,000	0,225	0,550	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050
HUS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,477	0,023	0,205
ASTEL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,147
ANUD	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,500	0,083	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,021	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *AcR13V* в исследованных группах осетровых

AcR13V	**127**	**129**	**133**	**135**	**139**	**141**	**145**	**147**	**149**
Общий	0,271	0,056	0,025	0,116	0,006	0,007	0,013	0,036	0,002
ABAE	0,460	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASCH	0,021	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AGUE	0,013	0,038	0,013	0,064	0,013	0,032	0,071	0,167	0,026
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,050	0,000	0,000	0,000
HUS	0,250	0,000	0,023	0,000	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,103	0,132	0,074	0,419	0,015	0,000	0,000	0,110	0,000
ANUD	0,000	0,333	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,302	0,198	0,083	0,281	0,000	0,021	0,052	0,010	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Ag18* в исследованных группах осетровых

Ag18	**198**	**202**	**216**	**220**	**224**	**228**	**232**	**234**	**236**	**238**	**240**
Общий	0,001	0,005	0,144	0,015	0,134	0,183	0,095	0,032	0,161	0,004	0,020
ABAE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,321	0,129	0,000	0,304	0,000	0,041
ASCH	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,115	0,063	0,000	0,208	0,000	0,031
AGUE	0,000	0,051	0,006	0,026	0,462	0,199	0,205	0,000	0,026	0,000	0,006
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,925	0,025	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025	0,350	0,000	0,450	0,075	0,000
HUS	0,000	0,000	0,000	0,205	0,523	0,273	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,007	0,000	0,809	0,000	0,184	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,458	0,042	0,417	0,000	0,042	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,271	0,000	0,021	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Ag18* в исследованных группах осетровых

Ag18	**244**	**248**	**250**	**252**	**256**	**258**	**260**	**262**	**266**	**270**	**274**
Общий	0,110	0,007	0,001	0,039	0,024	0,002	0,007	0,013	0,001	0,001	0,001
ABAE	0,195	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASCH	0,365	0,000	0,010	0,031	0,000	0,042	0,000	0,073	0,010	0,010	0,010
AGUE	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,025	0,075	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HUS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,313	0,198	0,000	0,063	0,073	0,000	0,000	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Ag10* в исследованных группах осетровых

Ag10	**212**	**216**	**220**	**224**	**226**	**228**	**232**	**238**	**242**	**246**
Общий	0,003	0,017	0,006	0,010	0,007	0,031	0,042	0,095	0,177	0,060
ABAE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,112	0,148	0,017
ASCH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,073	0,146	0,135
AGUE	0,000	0,096	0,000	0,083	0,000	0,006	0,013	0,000	0,179	0,071
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,600	0,075	0,000
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,175	0,000	0,375	0,050
HUS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,205	0,227	0,000	0,023	0,000
ASTEL	Амплификация не идет									
ANUD	0,167	0,333	0,333	0,000	0,000	0,042	0,042	0,000	0,042	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,052	0,104	0,135	0,094	0,365	0,219

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Ag10* в исследованных группах осетровых

Ag10	**250**	**252**	**254**	**258**	**262**	**266**	**268**	**272**	**274**	**282**
Общий	0,180	0,001	0,129	0,084	0,096	0,013	0,001	0,003	0,031	0,016
ABAE	0,186	0,000	0,157	0,112	0,167	0,014	0,001	0,004	0,055	0,027
ASCH	0,125	0,000	0,219	0,198	0,042	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000
AGUE	0,186	0,006	0,231	0,058	0,032	0,006	0,000	0,006	0,013	0,013
AMIK	0,275	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	0,150	0,000	0,100	0,050	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HUS	0,523	0,000	0,000	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	Амплификация не идет									
ANUD	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Afu39* в исследованных группах осетровых

Afu39	**86**	**116**	**118**	**120**	**122**	**124**	**125**	**128**	**130**	**132**
Общий	0,002	0,168	0,001	0,049	0,079	0,088	0,223	0,214	0,027	0,003
ABAE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,066	0,171	0,318	0,309	0,000	0,004
ASCH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,698	0,115	0,000	0,052	0,073	0,000
AGUE	0,026	0,000	0,006	0,000	0,058	0,051	0,167	0,038	0,000	0,000
AMIK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,500	0,150	0,000	0,000
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,775	0,075	0,000	0,050	0,100	0,000	0,000
HUS	0,000	0,000	0,000	0,545	0,000	0,000	0,045	0,000	0,386	0,023
ASTEL	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,438	0,552	0,010	0,000

Распределение частот аллелей микросателлитного локуса *Afu39* в исследованных группах осетровых

Afu39	**136**	**138**	**142**	**146**	**148**	**150**	**154**	**156**	**160**	**180**
Общий	0,003	0,036	0,062	0,010	0,002	0,014	0,006	0,008	0,004	0,002
ABAE	0,001	0,028	0,096	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASCH	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AGUE	0,006	0,109	0,160	0,077	0,019	0,128	0,064	0,051	0,038	0,000
AMIK	0,075	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,125	0,000	0,075
HDAU	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HUS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ASTEL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	0,000	0,875	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ARUT	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Приложение 2

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *Agu38*

Agu38	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	17	4,350	4,980	0,770	0,525	0,215	0,906
ABAE	6	3,080	3,750	0,676	0,693	-0,026	0,676
ASCH	9	5,870	5,750	0,830	0,583	0,304	0,830
AGUE	5	2,930	3,360	0,658	0,538	0,185	0,658
AMIK	4	2,770	3,410	0,640	0,683	-0,074	0,640
HDAU	8	5,790	5,790	0,828	0,750	0,101	0,828
HUS	2	1,050	1,270	0,046	0,045	0,000	0,046
ASTEL	3	1,510	2,440	0,340	0,397	-0,170	0,340
ANUD	3	1,760	3,000	0,439	0,500	-0,154	0,439
ARUT	3	2,050	2,420	0,513	0,188	0,637	0,513

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *An20*

An20	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	25	13,030	8,100	0,923	0,730	0,156	0,968
ABAE	11	6,940	6,230	0,856	0,832	0,028	0,856
ASCH	13	7,560	6,920	0,868	0,917	-0,058	0,868
AGUE	11	3,400	4,280	0,706	0,701	0,007	0,706
AMIK	4	2,640	3,610	0,622	0,650	-0,049	0,622
HDAU	7	3,940	4,380	0,747	0,767	-0,028	0,747
HUS	3	1,840	2,270	0,458	0,636	-0,403	0,458
ASTEL	8	2,260	3,680	0,557	0,529	0,049	0,557
ANUD	5	2,860	4,570	0,658	0,333	0,339	0,658
ARUT	7	2,760	3,500	0,638	0,667	-0,046	0,638

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *Aru18*

Aru 18	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	5	2,830	3,330	0,647	0,300	0,502	0,748
ABAE	4	1,420	2,460	0,296	0,304	-0,029	0,296
ASCH	2	1,110	1,490	0,100	0,104	-0,045	0,100
AGUE	5	1,190	1,920	0,159	0,158	0,005	0,159
AMIK	1	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	3	1,950	2,650	0,489	0,383	0,229	0,489
HUS	2	1,050	1,270	0,046	0,045	0,000	0,046
ASTEL	4	2,090	2,690	0,521	0,529	-0,016	0,521
ANUD	2	1,200	2,000	0,167	0,167	0,000	0,167
ARUT	2	1,420	1,920	0,295	0,354	-0,205	0,295

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *As043*

As043	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	34	14,430	8,280	0,931	0,863	0,058	0,954
ABAE	13	8,250	6,750	0,879	0,856	0,026	0,879
ASCH	20	15,250	8,630	0,935	0,910	0,028	0,935
AGUE	19	9,450	7,410	0,894	0,940	-0,052	0,894
AMIK	4	3,900	3,830	0,745	0,833	-0,130	0,745
HDAU	13	12,400	7,960	0,921	0,933	-0,015	0,921
HUS	4	3,150	3,530	0,683	0,636	0,070	0,683
ASTEL	14	9,270	7,140	0,892	0,868	0,028	0,892
ANUD	7	6,690	6,550	0,860	0,833	0,005	0,860
ARUT	13	10,410	7,440	0,904	0,896	0,009	0,904

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *Ls19*

Ls19	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	20	4,230	5,270	0,763	0,493	0,294	0,910
ABAE	5	2,530	3,320	0,605	0,546	0,097	0,605
ASCH	12	6,210	6,010	0,839	0,681	0,194	0,839
AGUE	14	7,890	6,720	0,873	0,825	0,057	0,873
AMIK	1	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	6	3,650	4,400	0,727	0,517	0,306	0,727
HUS	4	2,290	2,750	0,563	0,273	0,522	0,563
ASTEL	5	3,050	3,660	0,672	0,309	0,543	0,672
ANUD	4	3,940	4,000	0,758	1,000	-0,364	0,758
ARUT	2	1,500	1,950	0,333	0,333	0,000	0,333

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *Ag49a*

Ag 49a	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	25	5,270	5,590	0,810	0,548	0,250	0,889
ABAE	6	2,500	3,520	0,600	0,597	0,005	0,600
ASCH	14	4,070	5,850	0,755	0,743	0,016	0,755
AGUE	8	2,230	3,960	0,552	0,538	0,024	0,552
AMIK	5	3,340	4,000	0,701	0,717	-0,024	0,701
HDAU	7	4,570	4,960	0,782	0,283	0,656	0,782
HUS	3	2,140	2,270	0,534	0,955	-0,822	0,534
ASTEL	6	2,620	3,670	0,619	0,632	-0,022	0,619
ANUD	2	1,430	2,000	0,303	0,000	1,000	0,303
ARUT	2	1,070	1,330	0,061	0,063	-0,022	0,061

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *Agu37*

Agu37	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	10	3,770	4,390	0,735	0,534	0,257	0,849
ABAE	5	2,570	3,260	0,610	0,577	0,054	0,610
ASCH	6	4,330	4,480	0,769	0,569	0,266	0,769
AGUE	6	2,650	3,350	0,623	0,645	-0,036	0,623
AMIK	1	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	3	1,230	1,970	0,189	0,183	0,029	0,189
HUS	3	2,740	2,950	0,635	1,000	-0,596	0,635
ASTEL	3	2,960	2,970	0,662	0,456	0,313	0,662
ANUD	4	3,350	4,000	0,712	0,833	-0,190	0,712
ARUT	4	1,440	2,230	0,304	0,313	-0,028	0,304

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *Agu41*

Agu 41	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	21	9,780	7,280	0,898	0,559	0,231	0,945
ABAE	10	5,840	5,830	0,829	0,820	0,010	0,829
ASCH	11	6,790	6,370	0,853	0,757	0,116	0,853
AGUE	12	4,890	5,720	0,796	0,701	0,121	0,796
AMIK	4	3,830	3,850	0,740	0,850	-0,163	0,740
HDAU	10	4,110	5,930	0,758	0,483	0,381	0,758
HUS	4	1,210	2,020	0,174	0,091	0,485	0,174
ASTEL	5	3,610	4,070	0,723	0,118	0,838	0,723
ANUD	3	1,320	2,850	0,243	0,139	0,208	0,243
ARUT	7	3,160	4,020	0,684	0,229	0,667	0,684

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *AcR13V*

AcR13V	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	18	7,470	6,700	0,866	0,558	0,428	0,955
ABAE	5	3,130	3,690	0,681	0,388	0,431	0,681
ASCH	9	2,960	4,420	0,663	0,778	-0,180	0,663
AGUE	13	6,010	6,000	0,834	0,573	0,317	0,834
AMIK	1	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HDAU	6	2,850	4,190	0,650	0,383	0,430	0,650
HUS	6	3,140	3,760	0,682	0,773	-0,137	0,682
ASTEL	7	4,210	4,990	0,762	0,735	0,036	0,762
ANUD	4	3,040	4,000	0,682	0,833	-0,250	0,682
ARUT	9	4,690	5,010	0,787	0,833	-0,059	0,787

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *Ag18*

Ag18	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	22	8,160	6,410	0,877	0,656	0,187	0,890
ABAE	6	4,000	4,240	0,750	0,785	-0,048	0,750
ASCH	13	5,110	5,840	0,805	0,861	-0,073	0,805
AGUE	9	3,400	4,280	0,706	0,628	0,112	0,706
AMIK	3	1,170	1,820	0,145	0,083	0,444	0,145
HDAU	6	3,110	3,930	0,680	0,583	0,152	0,680
HUS	3	2,660	2,950	0,625	0,955	-0,547	0,625
ASTEL	3	1,460	2,010	0,314	0,382	-0,219	0,314
ANUD	5	2,860	4,570	0,658	0,333	0,339	0,658
ARUT	7	4,640	4,890	0,784	0,521	0,338	0,784

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *Ag10*

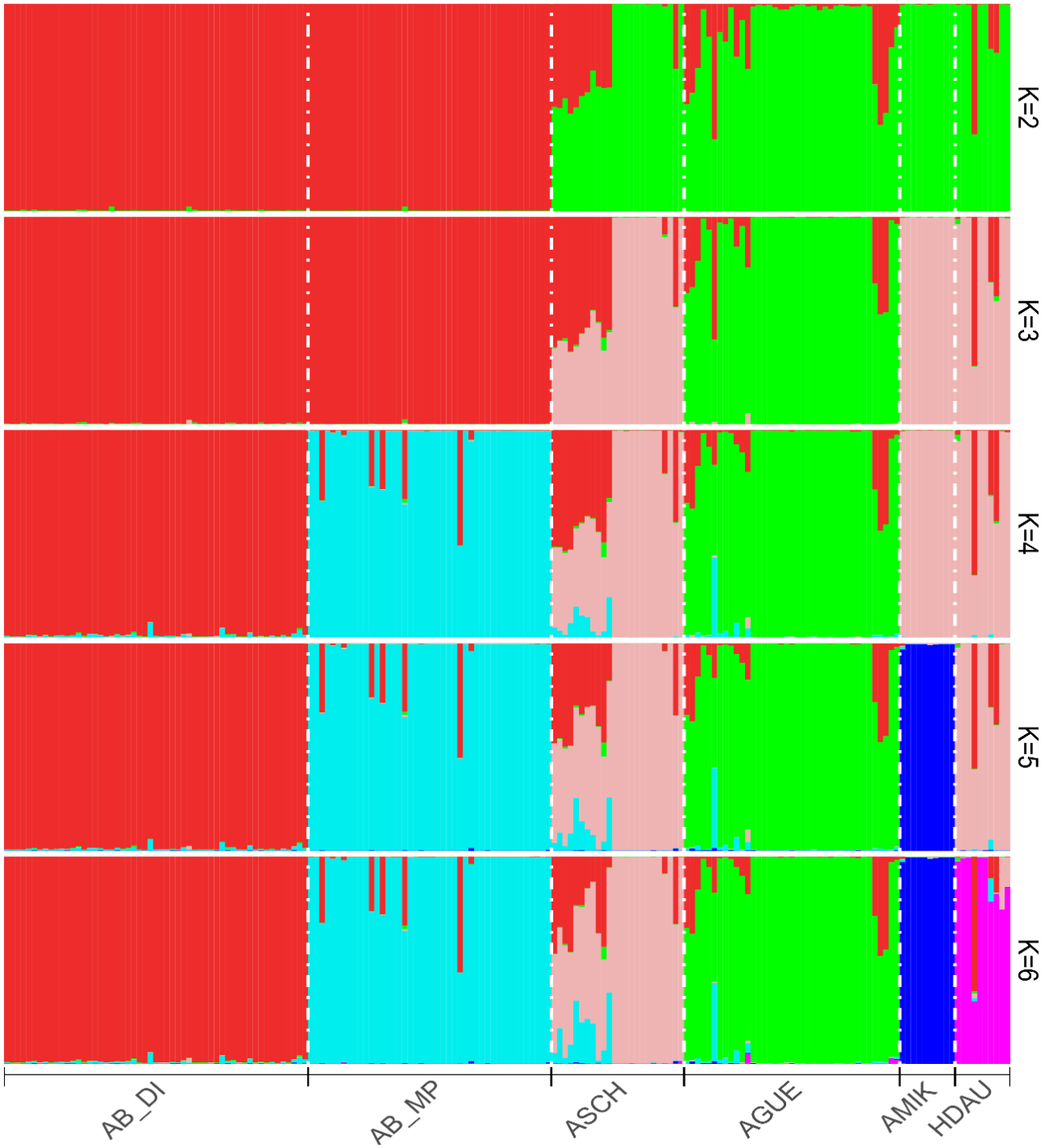
Ag10	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	20	8,850	6,930	0,887	0,749	0,161	0,914
ABAE	12	7,300	6,250	0,863	0,693	0,198	0,863
ASCH	8	6,920	6,030	0,856	0,847	0,010	0,856
AGUE	15	7,100	6,390	0,859	0,949	-0,106	0,859
AMIK	4	2,320	3,170	0,571	0,483	0,163	0,571
HDAU	8	5,140	5,670	0,806	0,583	0,293	0,806
HUS	5	2,830	3,480	0,647	0,727	-0,128	0,647
ASTEL	амплификация не идет						
ANUD	7	4,790	6,420	0,800	0,833	-0,024	0,800
ARUT	7	4,660	5,100	0,786	0,833	-0,061	0,786

Показатели генетического разнообразия осетровых видов по локусу *Afu39*

Afu39	N_A	N_{AE}	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	h
Общий	20	6,850	6,400	0,854	0,526	0,236	0,938
ABAE	9	4,180	4,570	0,761	0,790	-0,039	0,761
ASCH	5	1,970	3,470	0,493	0,465	0,058	0,493
AGUE	15	10,130	7,460	0,901	0,923	-0,025	0,901
AMIK	7	3,500	4,900	0,715	0,500	0,318	0,715
HDAU	4	1,640	2,960	0,391	0,350	0,113	0,391
HUS	4	2,290	2,750	0,563	0,045	0,921	0,563
ASTEL	1	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ANUD	3	1,320	2,850	0,243	0,139	0,208	0,243
ARUT	3	2,040	2,120	0,509	0,313	0,389	0,509

Приложение 3

Кластерный анализ тетраплоидных представителей осетровых рыб, выполненный на основании частот аллелей 12-ти микросателлитных локусов в программе STRUCTURE



Примечание: по оси X представлены особи исследованных видов, по оси У – коэффициент подобия Q, %. Для числа кластеров K = 2, K = 3; K=4; K=5, K=6.
AB_Di – сибирский осетр ленского происхождения ООО РТФ «Диана», AB_MP – сибирский осетр ленского происхождения МПЭРЗ, ASCH – амурский осетр, AGUE – русский осетр, AMIK – сахалинский осетр, HDAU – калуга.