ГЕНЕТИКА, 2009, том 45, № 9, с. 1250–1259

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.22:597.583.1

ВНУТРИВИДОВОЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ РУССКОГО ОСЕТРА (*Acipenser gueldenstaedtii*)

© 2009 г. Н. Н. Тимошкина[1], А. Е. Барминцева[2], А. В. Усатов[3], Н. С. Мюге[2]

[1]*Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства, Ростов-на-Дону 344014; e-mail:n_timoshkina@mail.ru*

[2]*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва 107140; e-mail:mugue@mail.ru*

[3]*Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону 344006; e-mail: usatova@mail.ru*

Поступила в редакцию 28.07.2008 г.

Исследован полиморфизм по ядерным (RAPD, микросателлиты) и митохондриальным (PCR-идентификации двух митотипов) маркерам трех популяций (азовская, каспийская, черноморская) русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, а также проведен морфометрический анализ представителей азовской популяции. По морфологическим признакам промежуточное положение между каспийской и азовской популяциями занимает черноморская, что отражает филогеографию этого вида. В соответствии с морфометрическими данными генетические дистанции (по результатам STR-анализа) также определили черноморскую популяцию между каспийской и азовской (F_{ST} = 0.058 и 0.043). Генетическое расстояние между азовской и каспийской популяциями несколько выше (F_{ST} = 0.070). Наибольший аллельный полиморфизм по четырем микросателлитным локусам наблюдается в каспийской популяции, наименьший – в Азовском море. RAPD-анализ выявил высокий внутрипопуляционный полиморфизм, но оказался непригоден для межпопуляционного анализа. С помощью метода, дифференцирующего "baerii-like" и типичный "gueldenstaedtii" митотипы, показано отсутствие "baerii-like" маркера в черноморской популяции, тогда как его частота в каспийской составляет 31.1% и в азовской – 1.8%. Обсуждаются возможные эволюционные причины выявленных межпопуляционных различий.

Русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833) – анадромный вид, относящийся к древней группе хрящевых ганоидов. Обладая большой коммерческой ценностью, он еще недавно был широко распространен во внутренних морях Евразии, однако в настоящее время из-за чрезмерного вылова и разрушения среды обитания вид приобрел статус редкого [1]. Сохранение русского осетра и поддержание его оптимальной численности предполагают восстановление генетического разнообразия с учетом популяционной структуры вида.

Ранее проведенные исследования выявили широкую вариабельность морфологических признаков [2, 3], высокий уровень полиморфизма белков крови [4] и митохондриальной ДНК [5, 6] русского осетра. При этом, основываясь на поведенческих, экологических и меристических признаках, одни авторы подразделяют вид на 3–4 географически изолированных подвида [2, 3] с несколькими нерестовыми популяциями в каждой, другие выделяют только популяции [1]. Кроме того, отсутствие четких фенов, специфичных для внутривидовых групп, требует тестирования больших выборок для идентификации отдельных особей.

Согласно современным представлениям, полиплоидизация была главным механизмом видообразования в пределах отряда Acipenseriformes. Кариотипы осетровых рыб содержат наборы хромосом от 4*n* до 16*n* [7] (по другим интерпретациям – 2*n*–8*n* [8, 9]), из которых большая часть – микрохромосомы [8]. Высокая степень плоидности генома затрудняет не только идентификацию отдельных хромосом, но и разработку молекулярных маркеров ядерной ДНК. В литературе приведены данные об оценке полиморфизма некоторых видов осетровых рыб с помощью AFLP и STR локусов [10–13]. Популяционная структура и полиморфизм *A. gueldenstaedtii* изучены в меньшей степени.

Цель настоящей работы – сравнительный анализ межпопуляционной изменчивости русского осетра как на основании стандартной морфометрии, так и с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) со случайными праймерами (RAPD-PCR), микросателлитного анализа (STR) и ПЦР-идентификации двух митохондриальных гаплотипов с помощью набора видоспецифичных праймеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили особи трех популяций (азовской, каспийской, черноморской) русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833, выловленные в 1999–2005 гг. в северо-западном участке Черного моря (86 экз.), в акватории Азовского моря (92 экз.), а также в северной части Каспийского моря (360 экз.). В работе также использовали спилы первого луча грудного плавника из ихтиологических сборов АзНИИРХ, проводившихся в Азовском море в течение 1960–1971 гг.

Для морфометрического исследования особей из Азовского моря использовали общепринятые признаки в систематике осетровых рыб: число лучей в спинном плавнике (D), число лучей в анальном плавнике (A), число жаберных тычинок (GR), количество спинных жучек (DS), количество боковых жучек (LS), количество брюшных жучек (VS), длина головы (C), абсолютная длина тела (AL) [1]. Для сравнительного анализа результаты аналогичных измерений рыб каспийской и черноморской популяций приведены из работ [2, 3].

Тотальную ДНК выделяли методом солевой экстракции [14] из фрагментов плавников, а также спилов плавниковых лучей, собранных ихтиологами АзНИРХа в течение длительного периода для документации возрастного состава популяции. Образец спила экспонировали в 50 мМ ЭДТА в течение 24 ч при комнатной температуре. После чего пробу подсушивали, измельчали и помещали в лизирующий буфер с протеиназой К (0.05 мг/мл). Лизис проводили в течение 18 ч при 56°С в термостатирующем шейкере. Дальнейшие этапы соответствовали процедуре [14]. Из 345 исследованных нами спилов у 265 образцов указанным методом удалось выделить ДНК, пригодную для ПЦР-диагностики. В остальных случаях ДНК в спилах оказалась деградирована вследствие долгого периода хранения при повышенной влажности.

Препараты ДНК использовали для RAPD-анализа (по 50 особей из популяции) и STR-анализа (от 80 до 360 особей в каждой выборке, см. табл. 5), а также для определения митотипов “baerii-like” (BL) или “gueldenstaedtii” (GUE) (размер выборки указан в табл. 7).

RAPD. В предварительных экспериментах из 30 случайных праймеров, различающихся по размеру и содержанию GC-пар, нами были отобраны пять праймеров (табл. 3), с помощью которых были получены четкие, стабильно воспроизводимые полиморфные спектры (рис. 1). ПЦР проводили в стандартных условиях [15] в термоциклере “Tetrad PTC-225” (MJ Research, США). Продукты амплификации фракционировали в 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ).

С помощью программы Phoretix 1D Database (“Nonlinear Dynamics”, Великобритания) RAPD-профили представляли в виде общей бинарной матрицы типа “объект–признак”, рассчитывали коэффициенты кросс-корреляции индивидуальных RAPD-спектров и проводили кластерный анализ.

Для анализа микросателлитной ДНК (STR) использовали четыре микросателлитных локуса: An20, Afug41, Afug51, AoxD165, первоначально разработанных для видов *A. naccarii* [16], *A. fulvescens* [17], *A. oxyrinchus* [11]. В табл. 1 приведены условия проведения ПЦР, оптимизированные для исследованного нами вида. ПЦР-продукты фракционировали в денатурирующем ПААГ согласно [18].

Для каждого микросателлитного локуса в соответствии с электрофоретической подвижностью полос были определены число и размеры аллелей.

Статистическая обработка данных. Учитывая доминантную природу RAPD-локусов и тетраплоидность исследованного вида, рассчитывали частоту рецессивного нуль-аллеля q_j^i, несмещенную оценку гетерозиготности H_j^i и ее дисперсию $Var(H_j^i)$ согласно [19, 20].

Частоту аллелей микросателлитных локусов p_i рассчитывали двумя методами. Для тетраплоидных видов, таких как русский осетр, характерно присутствие у отдельно взятой особи до четырех аллелей в локусе. Если на электрофореграмме присутствуют все четыре полосы разной длины (гетерозигота по всем четырем аллелям) либо имеется только одна полоса (гомозигота), то интерпретация аллельного состава не представляет трудностей. В случае наличия двух или трех полос определение аллельного состава не может быть проведено однозначно, так как не всегда ясно, какая полоса представлена несколькими копиями одного аллеля. В большинстве случаев для каждой особи можно было определить аллельный состав, учитывая неравномерность интенсивности полосы при так называемом “эффекте дозы”. Одновременно применялся разработанный нами метод подсчета частот аллелей, основанный на допущении равновесия по Харди–Вайнбергу и вычисляющийся без учета интенсивности амплифицированных полос (метод “минус-аллеля”). Частоты аллелей вычисляли следующим образом: $p_i = 1 - (N/N_j)^{1/4}$, где N – количество особей с генотипами, не содержащими аллель i, N_j – количество тетраплоидных особей в выборке j. Ранее нами было показано, что вычисление частот гаплотипов с помощью традиционного метода с учетом “эффекта дозы” и методом “минус-аллеля” дает очень сходные результаты. В серии экспериментов по искусственному скрещиванию распределение тетраплоидных аллелей в потомстве

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов, использованных в STR-анализе русского осетра

Локус	Размер аллелей, пн	$MgCl_2$, мМ	Диапазон уменьшения температуры отжига на I этапе (кол-во циклов)	Температура отжига на II этапе (кол-во циклов)
Afug41	265–173	2.2	63–58°C (10)	58°C (28)
Afug51	278–188	2.0	–	58°C (35)
An20	187–129	2.0	58–54.5°C (7)	54°C (28)
AoxD165	208–140	2.0	63–58°C (10)	58°C (28)

имело менделирующий характер, а "нуль-аллели" отсутствовали (данные не приводятся). Несмещенное внутригрупповое значение гетерозиготности H_E вычисляли по формуле: $H_E = (4N/(4N-1))(1-\sum p_i^4)$.

Для проверки применимости микросателлитного анализа с целью определения принадлежности каждой особи к конкретной популяции проводили "assignment test". Каждую особь тестировали на принадлежность к популяции на основании наблюдаемого и ожидаемого в каждой популяции распределения частот аллелей методом максимального правдоподобия, предложенного в [21].

F_{ST}-статистику Райта, генетическое расстояние по Нею D [22] вычисляли согласно [19] с помощью программы Arlequin.

Достоверность различий средних значений между изучаемыми выборками оценивали с помощью F-критерия Фишера, t-критерия и χ^2 [19, 23].

Маркеры митохондриальной ДНК – "baerii-like" (BL) и "gueldenstaedtii" (GUE) митотипы определяли с помощью метода видовой идентификации осетровых рыб, предложенного в работе [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологический полиморфизм популяций русского осетра

Результаты морфометрического анализа по восьми критериям приведены в табл. 2. Видно, что доминирующая по численности каспийская группа обладает большим размахом изменчивости по всем изученным признакам. Азовскую популяцию отличает наименьшее значение соотношения C/AL и более интенсивная скорость роста рыб. Согласно большинству морфометрических показателей, черноморская популяция занимает промежуточное положение по отношению к каспийской и азовской выборкам.

Проведенная с помощью F-критерия Фишера сравнительная межпопуляционная оценка средних значений выявила существенные различия только для скорости роста особей ($p < 0.05$). Следовательно, характер распределения значений морфометрических показателей, характеризующих особей русского осетра, требует исследования больших выборок и на практике затрудняет их популяционную идентификацию.

Межпопуляционные различия русского осетра по RAPD-маркерам

Характеристика RAPD-профилей, полученных для двух нерестовых популяций (каспийской и азовской) русского осетра, приведена в табл. 3. Размер проанализированных фрагментов варьировал от 250 до 1000 пн (рис. 1). Общее количество RAPD-локусов по пяти использованным праймерам составило 295 фрагментов, из которых 282 являются информативными.

Согласно данным табл. 4, сравниваемые выборки имеют высокий уровень полиморфизма. Однако кластерный анализ (UPGMA), проведенный на основании RAPD-спектров, не выявил межпопуляционных различий. Особи образовали отдельные кластеры независимо от занимаемых ими ареалов. На фоне высоких значений внутрипопуляционного полиморфизма (H_j^i, P) уровень межпопуляционной дифференциации оказался также недостоверным ($F_{ST} = 0.011$).

Межпопуляционные различия русского осетра по STR-локусам

Данные микросателлитного анализа трех популяций русского осетра по четырем локусам представлены в табл. 5, 6 и на рис. 2.

У всех проанализированных особей ($n = 540$) выявлено 58 аллелей. Число аллелей на локус в среднем варьировало от 11.5 (AoxD165) до 17.5 (Afug51). Каждая из исследованных популяций имела оригинальный набор аллелей, четко различающихся по частотам ($p < 0.01$). Исключение составил локус AoxD165, по которому не выявлено различий между каспийской и азовской популяциями. Следует отметить, что аллели, характерные для отдельной популяции или бассейна, на практике не могут служить популяционными маркерами из-за низких частот ($p_i < 0.01$).

Таблица 2. Сравнительная характеристика популяций *A. gueldenstaedtii* по морфометрическим показателям

Показатель		Популяции		
		каспийская	азовская	черноморская
Число лучей в спинном плавнике (D)	среднее значение	41.0	35.7	**36.3**
	пределы	33–51	27–41	**30–43**
Число лучей в анальном плавнике (A)	среднее значение	25.8	21.9	**23.9**
	пределы	21–33	18–25	**20–28**
Число жаберных тычинок (GR)	среднее значение	23.5	21.5	**21.8**
	пределы	19–29	16–26	**17–27**
Кол-во спинных жучек (DS)	среднее значение	12.1	**11.9**	12.0
	пределы	9–18	8–15	9–15
Кол-во боковых жучек (LS)	среднее значение	39.0	30.5	**34.2**
	пределы	30–50	25–36	27–38
Кол-во брюшных жучек (VS)	среднее значение	9.8	9.6	9.6
	пределы	7–12	8–11	7–12
C/AL, %		18.1	16.4	17.5
AL (16 лет), см	среднее значение	**121.6**	129.8	117.7
	пределы	–	115–166	–

Примечание. Жирным шрифтом отмечены значения, промежуточные при сравнении трех популяций. Размеры выборок каспийской и черноморской популяции варьируют от признака к признаку и приводятся по [3].

Таблица 3. Вариабельность RAPD-локусов русского осетра

Праймер	Последовательность праймеров 5'-3'	Кол-во анализируемых фрагментов	Кол-во полиморфных фрагментов	Кол-во фрагментов на особь	
				среднее	пределы
OPA-05	AGG-GGT-CTT-G	47	47	23.2	17–31
OPA-07	GAA-ACG-GGT-G	66	62	30.5	24–41
B-3	CAT-CCC-CCT-G	62	60	24.6	17–34
B-11	GTA-GAC-CCG-T	51	47	23.9	20–28
P-8	CCT-GAC-CAG-GCA-CTG-GCA-GA	69	66	29.2	19–38
Всего	–	295	282	–	–

Значения наблюдаемой гетерозиготности (H_O) по микросателлитным локусам близки к ожидаемым (H_E) (табл. 5). Исключение составляет локус Afug51, по которому во всех изученных группах отмечен дефицит гетерозигот ($H_O < H_E$). Наибольшее аллельное разнообразие по всем локусам выявлено в каспийской выборке. Поскольку средние значения F_{IS} в этой популяции близки к нулю, ее состояние соответствует условиям равновесия Харди–Вайнберга. Напротив, азовская и

Таблица 4. Показатели изменчивости анализируемых групп русского осетра по RAPD-локусам, полученным с помощью пяти праймеров

Популяция	Среднее значение q_j^i	t-критерий ($P < 0.001$)	Уровень полиморфизма P, %	Среднее значение гетерозиготности H_j^i	Дисперсия $Var\,(H_j^i)$
Азовская	0.813	5.809	92.3	0.379	0.060
Каспийская	0.799		93.6	0.396	0.059

Таблица 5. Значения показателей межпопуляционной изменчивости русского осетра по микросателлитным локусам

Локус	N	Число аллелей	Среднее число аллелей	Гетерозиготность наблюдаемая, H_O	Гетерозиготность ожидаемая, H_E	Коэффициент внутривыборочный, F_{IS}	Коэффициент полной выборки F_{IT}
Азовская популяция							
An20	86	11	2.55	0.940	0.969	0.033	0.042
Afug41	92	15	3.1	0.986	0.998	0.010	0.012
Afug51	81	13	2.4	0.730	0.999	0.267	0.267
AoxD165	80	10	2.6	0.911	0.957	0.035	0.072
Среднее значение						0.096	0.099
Каспийская популяция							
An20	379	13	2.78	0.971	0.971	–0.000	0.011
Afug41	378	23	3.35	0.995	0.999	0.005	0.004
Afug51	380	18	2.78	0.837	0.998	0.155	0.160
AoxD165	373	16	2.85	0.962	0.992	0.027	0.020
Среднее значение						0.046	0.049
Черноморская популяция							
An20	85	14	2.53	0.871	0.944	0.068	0.113
Afug41	78	15	2.50	0.971	0.997	0.025	0.028
Afug51	86	20	2.44	0.885	0.998	0.108	0.113
AoxD165	82	9	2.12	0.796	0.934	0.080	0.193
Среднее значение						0.109	0.111

черноморская популяции обнаружили недостаток гетерозигот (F_{IS} = 0.096 и 0.109 соответственно).

В табл. 6 приведены попарные значения генетических расстояний (F_{ST}-статистика), усредненные по четырем локусам, для изученных популяций русского осетра. Высокая вариабельность внутри популяций и тетраплоидная природа локусов определила небольшой уровень межпопуляционной изменчивости (1.9%). Тем не менее полученные значения F_{ST} для каждой пары исследованных групп достоверно значимы.

Для определения эффективности индивидуальной идентификации особей русского осетра STR-методом по четырем локусам в вероятностном тесте [21] была использована выявленная база аллельных частот для каждой популяции. Максимальная точность определения рассчитана для черноморской популяции – 94%, для каспийской популяции этот показатель составил 86%, для азовской популяции – только 64%. Выявленный уровень точности достаточен для популяционной идентификации особей из Черного и Каспийского морей, для азовской популяции, очевидно, необходимо исследовать дополнительно другие микросателлитные локусы.

Таблица 6. Матрица значений F_{ST} между выборками русского осетра

	Каспийская	Азовская	Черноморская
Каспийская	–		
Азовская	0.070	–	
Черноморская	0.058	0.043	–

Определение BL- и GUE-митотипов

Ранее неоднократно отмечалось присутствие у 30% особей русского осетра из Каспийского моря так называемого BL-митотипа (“baerii-like”), четко отличающегося от других митотипов, типичных для этого вида [24, 25], и характеризующегося высокой гомологией с мтДНК сибирского осетра (*A. baerii*).

В табл. 7 приведены данные по идентификации в исследованных выборках двух маркеров мтДНК: выше указанного BL-митотипа и типичного для русского осетра GUE-митотипа.

В черноморской выборке из 249 особей BL-митотип полностью отсутствует. Частота встречаемости BL-особей в каспийской популяции близка к ожидаемой и составила 0.313. В азовской популяции выделено две группы. В одной выборке, состоящей из особей поколений 1970–2005 гг., из 759 рыб выявлено 14 BL-особей. Во второй группе, представленной 102 особями из полностью сменившихся поколений 1931–1956 гг., BL-маркер не обнаружен.

Таблица 7. Количество особей с митотипами "baerii-like" (BL) и видоспецифичным (GUE) в популяциях русского осетра

Популяция	Кол-во исследованных особей	Кол-во особей с видоспецифичным (GUE) митотипом		Кол-во особей с "baerii-like" (BL) митотипом	
		абсолютное	%	абсолютное	%
Каспийская	527	362	68.69	165	31.31
Азовская (генерации 1931–1956 гг.)	102	102	100.00	0	0.00
Азовская (современная, генерации 1980–2005 гг.)	759	745	98.12	14	1.88
Черноморская (генерации 1945–1970 гг.)	163	163	100.0	0	0.00
Черноморская (современная, генерации 1975–2000 гг.)	86	86	100.00	0	0.00

ОБСУЖДЕНИЕ

Русский осетр – эндемик Понто-Каспийского бассейна, относится к древней реликтовой группе рыб, известной с верхнеюрского периода (более 240 млн. лет).

Данные литературы [2, 3] и результаты, полученные нами, свидетельствуют о высокой пластичности и изменчивости основных морфометрических характеристик русского осетра, что затрудняет их использование в качестве биологических маркеров для популяционной дифференциации вида (табл. 3).

Проведенный RAPD-анализ геномной ДНК выявил высокий уровень изменчивости (табл. 3, 4) и отсутствие различий между географически изолированными популяциями. Полиплоидное происхождение *A. gueldenstaedtii* в целом определяет его повышенную гетерозиготность, большое число полиморфных локусов и количество аллелей на локус [26].

В предварительных экспериментах нами было выявлено тетрасомное наследование микросателлитных локусов русского осетра, что характерно для тетраплоидов. Для видов с повышенной плоидностью показана низкая степень дивергенции популяций вследствие слабого действия отбора и дрейфа генов из-за низкой частоты гомозигот [27]. Тем не менее использование STR показало хотя и небольшие, но достоверно значимые межпопуляционные различия русского осетра по четырем микросателлитным локусам (табл. 6). Отметим, что наибольшее значение генетических дистанций наблюдается между каспийской и азовской популяциями, в то время как черноморская популяция занимает промежуточное положение.

В черноморской и азовской популяциях STR-анализ выявил дефицит гетерозигот (табл. 5). В черноморской популяции этот феномен можно объяснить эффектом Валунда [19], в связи с тем, что она включает в себя две нерестовые субпопуляции – днепровскую и дунайскую. Так как отбор проб проводился в море, идентифицировать особей по происхождению не представлялось возможным. Дефицит гетерозигот в азовской популяции, вероятно, связан с резким падением ее численности за последнее десятилетие, а также с действием инбридинга вследствие ограниченного количества производителей при искусственном разведении [28]. С другой стороны, дефицит гетерозигот может объясняться асимметричным строением квадриплетов гомологичных хромосом тетраплоидного генома на первом делении мейоза, связанным с амфидиплоидной (аллотетраплоидной) природой многохромосомных видов осетровых.

История расселения осетровых рыб неразрывно связана с геологической историей системы крупных евразийских бассейнов. В настоящее время русский осетр обитает в пределах морей, весьма различающихся по экологическим особенностям, а его внутривидовая дифференциация связана с эволюцией трех морей. Известно существование распресненного водоема, располагавшегося в Азово-Черноморском бассейне, связь которого со Средиземным морем прекратилась в конце плейстоцена вследствие падения уровня воды [29] (15–40 тыс. лет назад). Более того, Азовское море в этот период исчезало и

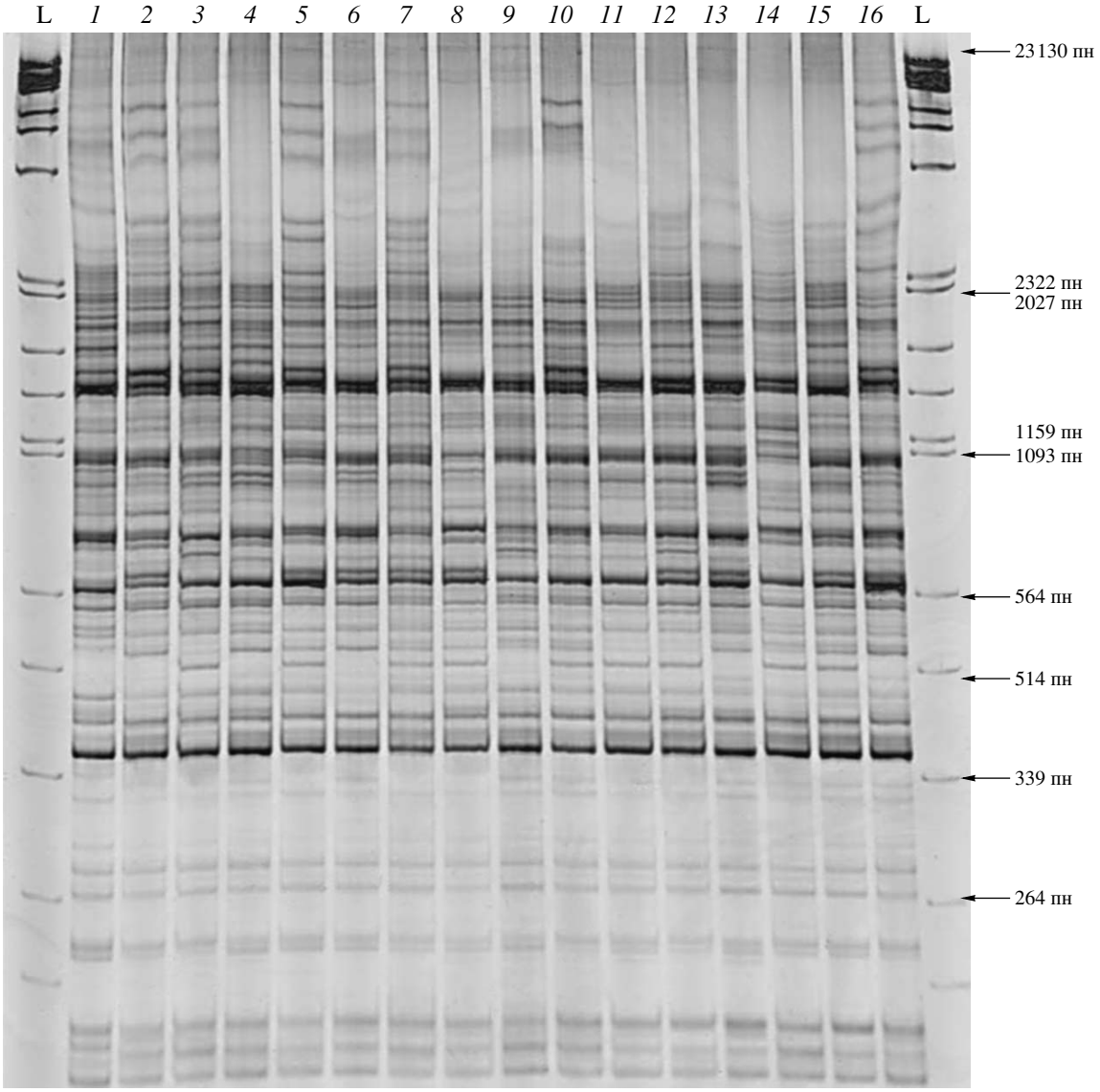

Рис. 1. RAPD-спектры русского осетра, полученные с помощью праймера OPA-07. *1–8* – особи из азовской популяции, *9–16* – особи из каспийской популяции, L – маркер молекулярной массы ДНК λ/*Pst*I *Hind*III (Fermentas).

превращалось в низменную долину, пересекаемую рекой Дон. Отсутствие BL-митотипа в черноморской популяции свидетельствует о незначительности или отсутствии миграции русского осетра из Каспийского моря в бассейн Черного моря по существовавшему непродолжительное время в конце ледникового периода Кумо-Манычскому водосбросу. Последовавшая затем трансгрессия Черного моря, вызванная прорывом средиземноморских соленых вод через Босфор, и появление вследствие подъема уровня вод Азовского моря позволило сформироваться азовской популяции русского осетра из части черноморской популяции и закрепила изоляцию популяций русского осетра в северо-западной части Черного моря и Азове. Таким образом, можно предположить, что черноморская популяция произошла от каспийской, а азовская в свою очередь – от черноморской, что объясняет промежуточное положение черноморской популяции как по морфометрическим показателям, так и по данным микросателлитного анализа. Данные о распространении митохондриального BL-маркера (табл. 7) в современных популяциях и отсутствие

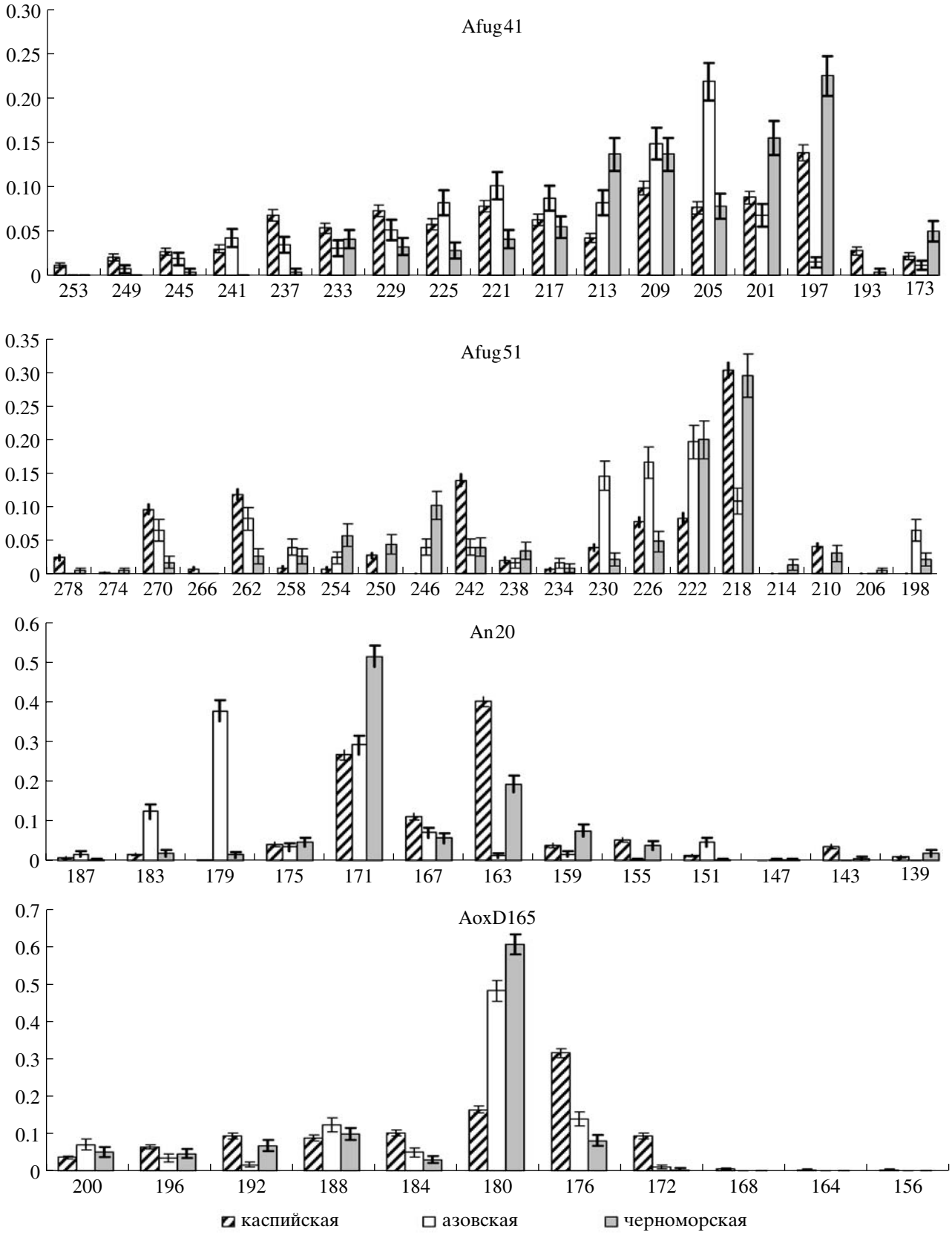

Рис. 2. Распределение частот аллелей микросателлитных локусов в различных популяциях русского осетра. По осям абцисс – размеры аллелей, пн; по осям ординат – аллельные частоты, выраженные в долях.

его в Черном море позволяют сделать предположение о том, что появление осетров с BL-митотипом в Азовском море, вероятнее всего, произошло в XX в., когда проводилась интродукция каспийский осетровых в Азовское море [28], что подтверждается отсутствием маркера в выборке азовского осетра до 1960-х годов (до начала планомерного вселения осетра из Каспия, данные по анализу спилов плавников).

Таким образом, история расселения русского осетра и изоляция его локальных популяций вследствие геологических преобразований внутриевразийских водоемов отразилась на его генетической структуре. Обнаруженное появление BL-маркера мтДНК в Азовском море свидетельствует об изменениях в сложившейся популяционной структуре и генном разнообразии русского осетра уже в исторический период, которые активно вносит человек посредством искусственного воспроизводства вида и интенсивного рыболовства. Использование исследованных маркеров микросателлитной и митохондриальной ДНК позволяет с высокой точностью определять популяционную принадлежность русского осетра.

Авторы признательны М.А. Махоткину за разработку программного обеспечения для обработки результатов, а также выражают благодарность И.М. Чурай и В.Ю. Шевченко за помощь в сборе материалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vecsei P., Charette R., Hochleithner M. et al.* Guide to the Identification of Sturgeon and Paddlefish Species Controlled under the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Ottava: CITES, 2004. P. 30–33.
2. *Берг Л.С.* Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1948. Ч. 1. С. 78–86.
3. *Подушка С.Б.* О систематическом положении азовского осетра // Научн.-технич. бюл. лаборатории ихтиологии ИНЭНКО. СПб., 2003. Вып. 7. С. 19–44.
4. *Субботкин М.Ф.* Сравнительный иммунохимический анализ межвидовых и внутривидовых особенностей сывороточных белков трех видов осетровых рода *Acipenser* // Вопр. ихтиологии. 1987. Т. 27. № 5. С. 794–800.
5. *Doukakis P., Birstein V.J., De Salle R.* Intraspecific structure within three caviar-producing sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii, A. stellatus* and *Huso huso*) based on mitochondrial DNA analysis // J. Appl. Ichthyol. 2005. V. 21. P. 457–460.
6. *Birstein V.J., Doukakis P., DeSalle R.* Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: forensic and evolutionary implications // Cons. Gen. 2000. V. 1. P. 81–88.
7. *Birstein V.J., Hanner R., DeSalle R.* Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches // Sturgeon Biodiversity and Conservation / Eds Birstein V.J., Waldman J.R. and Bemis W.E. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 127–155.
8. *Fontana F., Tagliavini J., Congiu L.* Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives // Genetica. 2001. V. 111. P. 359–373.
9. *Ludwig A., Belfiore N.M., Pitra C. et al.* Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) // Genetics. 2001. V. 158. № 3. P. 1203–1215.
10. *Congiu L., Fontana F., Patarnello T. et al.* The use of AFLP in sturgeon identification // J. Appl. Ichtyol. 2002. V. 18. P. 268–289.
11. *King T.L., Lubinski B.A., Spidle A.P.* Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and cross-species amplification in the Acipenseridae // Cons. Gen. 2001. V. 2. P. 103–119.
12. *Henderson-Arzapalo A., King T.L.* Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management// Mol. Ecol. Notes. 2002. V. 2. P. 437–439.
13. *Welsh A., May B.* Development and standardization of disomic microsatellite markers for lake sturgeon genetic studies // J. Appl. Ichthyol. 2006.V. 22. P. 337–344.
14. *Aljanabi S.M., Martinez I.* Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. 1999. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
15. *Зеленина Д.А., Хрусталева А.М., Волков А.А.* Сравнительное исследование популяционной структуры и определение популяционной принадлежности нерки (*Oncorhynchus nerka*) Западной Камчатки с помощью RAPD-PCR и анализа полиморфизма микросателлитных локусов // Генетика. 2006. Т. 42. № 5. С. 693–704.
16. *Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al.* Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (Acipenser naccarii) // Mol. Ecol. Notes. 2002. V. 2. P. 586–588.
17. *Welsh A.B., Blumberg M., May B.* Identfication of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipernser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* // Mol. Ecol. Notes. 2003. V. 3. P. 47–55.
18. *Muyzer G., Smalla K.* Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology // Antonie Van Leeweenhoek. 1998. V. 73. P. 127–141.
19. *Хедрик Ф.* Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 592 с.
20. *Токарская О.Н., Ефремова Д.А., Канн Н.Г. и др.* Изменчивость мультилокусных маркеров ДНК в популяциях сибирской (*Capreolus pygargus* Pall.) и европейской (*C. capreolus* L.) косуль // Генетика. 2000. Т. 36. № 11. С. 1520–1530.
21. *Hansen M., Kenchington E., Nielsen E.E.* Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers // Fish and Fisheries. 2001. № 2. P. 93–112.
22. *Nei M.* Genetic distance between populations // Am. Naturalist. 1972. V. 106. P. 283–292.

23. *Lewontin R.C.* The apportionment of human diversity // Evol. Biol. 1972. № 6. P. 381–398.

24. *Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Расторгуев С.М. и др.* Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика. 2008. Т. 44. № 7. С. 913–919.

25. *Jenneckens I., Meyer J.-N., Debus L. et al.* Evidence of mitochondrial DNA clones of *Siberian sturgeon, Acipenser baerii*, within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, caught in the River Volga // Ecol. Lett. 2000. V. 3. P. 503–508.

26. *Moody M.E., Mueller L.D., Soltis D.E.* Genetic variation and random drift in autotetraploid populations // Genetics. 1995. V. 134. P. 649–657.

27. *Soltis D.E., Soltis P.S.* The dynamic nature of polyploidy genomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 8089–8091.

28. *Реков Ю.И.* Динамика численности и структура популяции азовского осетра в условиях изменяющегося режима моря: Дис. … канд. биол. наук. М.: АзНИИРХ, 2000. 112 с.

29. *Свиточ А.А., Селиванова А.О., Янина Т.А.* Новейшая история трех морей // Природа. 1999. № 12. С. 17–25.

Intraspecific Genetic Polymorphism of Russian Sturgeon *Acipencer gueldenstaedtii*

N. N. Timoshkina[a], A. E. Barmintseva[b], A. V. Usatov[c], and N. S. Mugue[b]

[a]*Azov Research Institute of Fisheries, Rostov-on-Don, 344014 Russia*
e-mail: n_timoshkina@mail.ru
[b]*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, 107140 Russia*
e-mail: mugue@mail.ru
[c]*Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344006 Russia*
e-mail: usatova@mail.ru

Three populations (Azov, Caspian, and Black Sea) of Russian sturgeon *Acipenser queldenstaedtii* were tested for polymorphism at nuclear (RAPD and microsatellites) and mitochondrial (PCR identification of two mitotypes) markers. In addition, morphometric analysis of he representatives of Azov population was carried out. According to the morphological characters, the Black Sea population occupied an intermediate position between the Caspian and Azov populations, reflecting the phylogeography of this species. In agreement with the morphometric data, genetic distances (the data of STR analysis) also placed the Black Sea population between the Caspian and Azov populations (F_{ST} = 0.058 and 0.043). The genetic distance between the Azov and Caspian population was somewhat higher (F_{ST} = 0.070). The highest allelic polymorphism at four microsatellite loci was found observed in Caspian population, while the lowest polymorphism was in the Sea of Azov. RAPD analysis distinguished high polymorphism within the populations, although it was not feasible for interpopulation analysis. Using the method differentiating the "baerii-like" and typical "gueldenstaedtii" mitotypes, the absence of the "baerii-like" marker in the Black Sea population was demonstrated. The frequency of this marker in Caspian and Azov populations constituted 31.1 and 1.8%, respectively. Possible evolutionary reasons for the interpopulation differences observed are discussed.