УДК: 597.4:575.22

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ВНУТРИ- И МЕЖВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА ОСЕТРОВЫХ РЫБ *(ACIPENSERIFORMES)*

© Н. Н. Тимошкина [1], Д. И. Водолажский [1], А. В. Усатов [2]

[1] Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону;
[2] Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

❀ **Уникальность и высокая коммерческая ценность реликтовой группы осетровых рыб стимулировали исследования их генетического полиморфизма. В обзоре рассмотрены основные молекулярно-генетические маркеры, используемые для оценки генетической изменчивости; обсуждены их достоинства и недостатки, приведены примеры их применения, в основном, на *Acipenseriformes* Евразии. Кратко освещены проблемы генетического анализа полиплоидных видов.**

❀ **Ключевые слова:** генетический полиморфизм; *Acipenseriformes*; полиплоидия; молекулярно-генетические маркеры.

Осетровые рыбы (отряд *Acipenseriformes*), до недавнего времени широко распространенные в Северном полушарии, известны как реликтовая группа (более 200 млн. лет). Высокая коммерческая ценность, стимулирующая интенсивный вылов, и потеря части ареала обитания вследствие строительства гидротехнических сооружений, препятствующих проходу половозрелых особей к местам нереста в верховья рек, привели к повсеместному резкому снижению численности *Acipenseriformes*. По данным IUCN 24 вида этого отряда имеют статус редких, а некоторые из них, находятся на грани исчезновения. Угрожающее состояние природных популяций осетровых рыб послужило основанием для включения их в Приложения CITES, — организации, регламентирующей международную торговлю редкими видами флоры и фауны (Raymakers, 2006).

Acipenseriformes характеризуются высокой экологической пластичностью и морфологической изменчивостью. Исторически классификация осетровых рыб базируется на изменчивости морфологических признаков, из многообразия которых чаще всего используют меристические признаки, так как они наименее изменчивы в онтогенезе рыб (Vecsei et al., 2004). Пластические признаки, характеризующие форму тела и относительные размеры его частей, наиболее информативны при индивидуальной идентификации. Однако они существенно изменяются в зависимости от возраста, размера, пола, сезона и среды обитания. В ранее проведенных исследованиях с различным успехом использовали морфологические, физиологические и экологические особенности для дискриминации родов, видов и популяций *Acipenseriformes* (Берг, 1948; Бабурина, 1957; Цветненко, 1993; Шляхов, 1994; Debus et al., 2002; Kyhard et al., 2002; Подушка, 2003, 2007; Артюхин, 2008; Калмыков и др., 2009). Отметим, что варьирование фенотипа под воздействием факторов внешней среды (модификационная изменчивость) часто ставит под сомнение результаты популяционных исследований на основании морфологических различий.

Для филогенетических и таксономических исследований, а также в целях сохранения и восстановления запасов осетровых рыб в дополнение к морфологии все чаще используют молекулярно-генетические методы. Оценка внутри- и межвидового генетического полиморфизма необходима для исследования микроэволюционных процессов, закономерностей их динамики во времени и пространстве, определения популяционно-генетической структуры, степени генетического разнообразия природных и искусственных популяций и, как следствие, понимания причин происходящих в них изменений. В основной части статьи приведен сравнительный анализ результатов ис-

Поступила в редакцию 15.10.2009
Принята к публикации 05.02.2010

следований осетровых рыб Евразии за последние десять лет, полученных с помощью молекулярно-генетических маркеров.

1.1. ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Генетический анализ осетровых рыб имеет ряд особенностей, обусловленных, главным образом, организацией их генома. Во-первых, *Acipenseriformes* характеризуются медленной молекулярной эволюцией (Brown et al., 1996; Birstein, 1997). Результаты сравнительных исследований нуклеотидных последовательностей митохондриальных и ядерных генов свидетельствуют, что скорость замен в этой группе почти в два раза ниже, чем у костистых рыб Teleostei (Krieger, Fuerst, 2002). Этот феномен предположительно связан с полиплоидным происхождением осетровых рыб.

Хрящевые ганоиды объединяют полиплоидные многохромосомные виды рыб, кариологически разделенные на три группы: первая группа с 112–146 хромосомами (например, белуга *Huso huso*, стерлядь *Acipenser ruthenus*, севрюга *A. stellatus*), вторая группа с 250–270 (русский осетр *A. gueldenstaedtii*, сибирский осетр *A. baerii*, адриатический осетр *A. naccarii*), третья — с 360–370 хромосомами (*A. brevirostrum*) (Vasil'ev, 2009). Впервые предположение о полиплоидности *Acipenseriformes* было высказано в работах, выявивших большое содержание ДНК, а также возможность разложения кариотипов в 4-хромосомные группы (Васильев, 1985; Birstein, 1993). Сегодня существует две гипотезы видообразования у хрящекостных *Chondrostei*. Первая из них базируется на автополиплоидии общего 60-хромосомного предка около 300 млн. лет назад с последующими вторичными дупликациями генома дивергировавших видов (Birstein et al., 1997). Вторая гипотеза «автоматической полиплоидизации» предполагает аллоплоидную схему происхождения осетровых рыб, путем образования одно-двуполых комплексов различной плоидности с периодической межвидовой гибридизацией (Vasil'ev, 2009).

Современные виды *Acipenseriformes*, очевидно, находятся на разных уровнях диплоидизации. Именно возвращением к структурно-функциональной диплоидности генома авторы объясняли отсутствие квадривалентных или октовалентных структур в мейотических кариотипах сперматоцитов белого осетра *A. transmontanus* (2n ~270 хромосом) (Van Eenennaam et al., 1998). Позже анализ плоидности *Acipenseriformes*, проведенный Людвигом с соавт. с помощью 6 микросателлитных локусов, показал, что виды с 120 хромосомами функционально диплоидные, виды с 240 — тетраплоидные, с 480 — октаплоидные (Ludwig et al., 2001). Следовательно, относительно анцестрального кариотипа осетровые виды 4-, 8- и 12-плоидные, а с учетом диплоидизации эти же виды 2-, 4- и 6-плоидные.

Полиплоидность генома осетровых рыб поставила перед исследователями задачу развития статистического анализа генетических данных, так как подавляющее большинство используемых математических моделей и компьютерных программ (TFPGA, Genepop, Microsatellite analyzer (MSA), Arlequin) основываются на предположении о диплоидном наследовании и частотах гаплотипов, соответствующих равновесию Харди-Вайнберга. Возможный методический прием для упрощения статистической обработки заключается в использовании алгоритмов, разработанных для доминантных AFLP, RAPD и ISSR маркеров (Rodzen et al., 2004). В работе, посвященной исследованию популяционной дифференциации русского осетра, оценку частот аллелей тетраплоидных микросателлитных локусов проводили методом «минус-аллеля», осуществляющегося без учета типа гетерозигот (Тимошкина и др., 2009). Кроме того, активно ведется поиск ядерных маркеров, которые наследуются по диплоидной схеме (Ludwig et al., 2001; Pyatskowit et al., 2001; McQuown et al., 2002).

1.2. БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Общие принципы метода разделения белков путем электрофореза были заложены еще в 1950-х гг. (Гааль и др., 1982). Суть данных методов заключается в том, что белковые макромолекулы, различающиеся по суммарному электростатическому заряду и/или по молекулярному весу, фракционируют электрофорезом в различных гелях-носителях. Наследование аллозимных маркеров, обычно, соответствует кодоминантному типу, т. е. метод позволяет учитывать гомо- и гетерозиготные особи.

Основным ограничением метода электрофоретического разделения белковых молекул является его относительно низкая разрешающая способность (Hallerman, Beckman, 1988). Более того, в силу своей высокой функциональной значимости подавляющее большинство белковых маркеров не относятся к селективно нейтральным (Левонтин, 1978). Следовательно, выявляемая изменчивость существенно ограничена приспособленностью к условиям среды. Среди методических трудностей отметим и строгие требования к качеству образцов: на результаты метода сильное влияние оказывает исходная степень деградации биологического образца и вид ткани. Тогда как во многих случаях немногочисленность и ценность осетровых рыб не позволяет произвести полноценный отбор проб. Разработка более чувствительных, селективно нейтральных методов ДНК-типирования постепенно вытесняет белковый электрофорез.

Ранее, с помощью электрофореза белков крови был изучен генетический полиморфизм некоторых осетровых рыб (Рябова и др., 2008). Исследования севрюги,

белуги и русского осетра из Азовского и Каспийского моря показали различия между популяциями по частотам четырех полиморфных белков (Чихачев, Цветненко, 1984). Ряд авторов отмечали высокий полиморфизм белков сыворотки крови каспийской севрюги (Лукьяненко и др., 1977; Рябова и др., 1995; Pourkazemi, 1996). Однако зависимость от функционального статуса организма и выявляемый уровень полиморфизма белков крови ограничивает их информативность для дискриминации популяций и даже видов осетровых рыб (Лукьяненко и др., 1977; Лукьяненко и др., 2002). Так, в работе Кузьмина (1991), исследовавшего с помощью изоферментов малат-дегидрогеназы (MDH) популяционную структуру *A. ruthenus* из рек Дон и Кама, а также *A. baeri* из реки Обь, не удалось дифференцировать эти два вида, продемонстрировавших высокую гомологию по аллелям локуса MDH.

1.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Разнообразные методы оценки ДНК-полиморфизма в зависимости от поставленных целей успешно используют на различных уровнях: от индивида и популяции до отрядов и надотрядных категорий. Во многих случаях вариабельные ДНК-маркеры позволяют обнаружить генетические различия, не распознаваемые методами электрофореза белков (Smith, McVeagh, 2000).

Начало анализа структуры ДНК было положено в 1970–1980 гг. после разработки метода прямого определения нуклеотидной последовательности. Сегодня наиболее распространен метод ферментативного секвенирования по Сэнгеру с использованием дидезокситерминаторов синтеза цепи ДНК (Sanger et al., 1977). Однако обладая наибольшей диагностической мощностью, секвенс-анализ из всех ДНК-методов более дорогой и трудоемкий. Позже был разработан рестрикционный анализ полиморфизма длин фрагментов (RFLP — Restriction Fragment Length Polymorphism), основанный на специфичном разрезании молекулы ДНК ферментами — рестриктазами (Lansman et al., 1981). Полиморфизм ДНК, выявляемый RFLP методом, позволил дифференцировать 17 из 22 изученных видов *Acipenseriformes*, за исключением близкородственных видов *A. gueldenstaedtii, A. persicus* и трех видов рода *Scaphirhynchus* (Ludwig et al., 2002).

В настоящее время широко используемым инструментом ДНК-анализа стал метод полимеразной цепной реакции (ПЦР или PCR — Polymerase Chain Reaction), разработанный в 1985 г. (Saiki et al., 1985). Чувствительность ПЦР позволяет успешно анализировать деградированную ДНК из музейных и археологических проб, что дает возможность восстанавливать исходный ареал обитания и популяционную структуру осетровых, ставших чрезвычайно редкими видами (de la Hera et al., 2004; Тимошкина и др., 2007; Garrido-Ramos et al., 2009).

Оценка полиморфизма ДНК зависит от выбранного типа маркеров. Так, последовательности, кодирующие первичную структуру белков, напрямую связаны с фенотипом и не являются селективно нейтральными с точки зрения отбора (исключая случаи синонимичных замен). Селективная нейтральность маркера становится особенно важной в вопросе эволюционной истории популяций. В противном случае филогенетические древа популяций, основанные на данных о частотах аллелей и гаплотипов, окажутся статистически смещенными (Zhivotovsky, Feldman, 1995). Ниже приведена краткая характеристика некоторых ДНК-маркеров, которые используют для оценки генетического полиморфизма.

1.3.1. RAPD-полиморфизм ДНК

В основе метода RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) лежит ПЦР-амплификация анонимных участков ДНК с помощью одного, обычно короткого (до 10 пар нуклеотидов, пн) праймера произвольной последовательности, который индуцирует в каждой реакции синтез до нескольких десятков фрагментов ДНК случайной локализации (Williams et al., 1993). Возможность исследовать полиморфизм всего генома без предварительного знания конкретных последовательностей ДНК составляет главное преимущество RAPD-анализа. Высокий уровень полиморфизма, определяемый RAPD-методом, является достаточно информативным в популяционных исследованиях, для выявления скрытого генетического полиморфизма в линиях и близкородственных видах, а также индивидуальной идентификации (Barmintsev et al., 2001; Алтухов, 2003; Зеленина и др., 2006).

Следует отметить, что RAPD-маркеры наследуются как доминантные признаки, что не позволяет отличить доминантную гомозиготу от гетерозиготы и рецессивную гомозиготу от неамплифицированной последовательности. Для преодоления этого недостатка метода был разработан оригинальный математический аппарат, с помощью которого учитывают частоту рецессивного условного «нуль-аллеля» (Zhivotovsky, 1999).

Из отрицательных сторон заслуживает внимания низкая воспроизводимость RAPD-анализа, обусловленная неспецифичностью праймеров, индуцирующих амплификацию полос различной интенсивности, образование гетеродуплексов и т. п. (Weising et al., 2005). Ограничивает применение данной методики и высокие требования к качеству матрицы и потенциальная негомологичность RAPD-бэндов (на электрофореграмме один фрагмент может содержать разные нуклеотидные последовательности одного размера). Отметим, что при разработке метода подчеркивалась потенциальная возможность построения с помощью RAPD-маркеров карт сцепления с конкретными локусами. Тем не менее, успехи в этой области более чем скромны, к тому же такие работы требуют довольно затратного масштабного скрининга. Так, например, с целью выявления ДНК-маркеров,

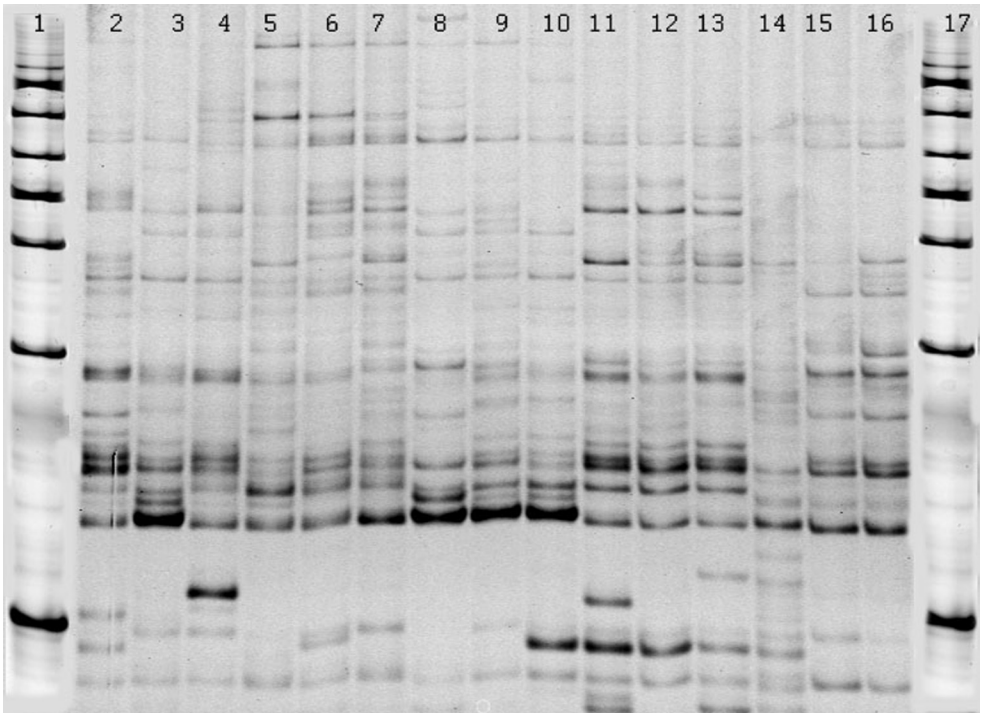

Рис. 1. AFLP-спектры осетровых видов рыб, полученные с помощью селективных праймеров Msp-CGC. На дорожках 1,17 — маркеры молекулярной массы ДНК PstI/HindIII (Fermentas), 2–4 — *A. gueldenstaedtii*; 5–7 — *A. baerii*; 8–10 — *H. huso*, 11–13 — *A. ruthenus*, 14–16 — *A. stellatus*

диагностирующих пол белуги, были использованы 310 случайных праймеров различной структуры, однако из 4146 полученных бэндов ни один не был сцеплен с полом (Keyvanshokooh et al., 2007).

В исследованиях осетровых рыб RAPD в основном применяется на видовом уровне, когда дифференциация основывается на обнаружении ряда видоспецифичных бэндов. С помощью восьми различных RAPD праймеров были дискриминированы шесть видов осетровых рыб (Comincini et al., 1998). Позже, используя RAPD, наблюдали только незначительные различия между близкородственными видами *A. persicus* и *A. gueldenstaedtii* (Gharaei et al., 2005). В работе Рожкован и др. (2008) для идентификации четырех межвидовых гибридов от скрещивания *A. schrenckii, A. baerii* и *A. ruthenus* успешно использовали 10 RAPD праймеров. Следует отметить, что идентификация межвидовых гибридов осетровых особенно актуальна в условиях их интенсивного разведения в аквакультуре.

1.3.2. AFLP-полиморфизм длины амплифицированных фрагментов ДНК

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) можно рассматривать как комбинацию RAPD и RFLP методов. Суть AFLP-анализа заключается в избирательной амплификации фрагментов, полученных при рестрикции тотальной ДНК (Vos et al., 1995). Несмотря на другой принцип реализации, метод AFLP, как и RAPD, амплифицирует анонимные участки преимущественно некодирующей ДНК. AFLP-маркеры также обладают менделевским наследованием доминантного типа. Поэтому для описываемой методики характерны те же преимущества и недостатки, указанные выше для RAPD. Однако, в отличие от RAPD-анализа, AFLP обладает лучшей воспроизводимостью результатов (Mueller and Wolfenbarger, 1999). В работе Конгю с соавт. (Congiu et al., 2002) впервые обсуждалась возможность идентифицировать гибриды осетровых на основании сравнения AFLP-фингерпринтов исследуемой выборки с эталонными спектрами родительских видов. На рисунке 1 показаны AFLP-спектры некоторых видов осетровых рыб. Широкому применению AFLP-маркеров препятствует громоздкость и длительность процедуры, существенно снижающие производительность анализа.

1.3.3. Анализ полиморфизма SNP

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) — полиморфизм единичного нуклеотидного сайта. Метод представляет собой идентификацию аллельных вариантов (замен) однонуклеотидного сайта какой-либо ДНК последовательности с помощью автоматизированного сиквенса и/или микрочипов (microarrays), представляющих собой ДНК-микропанели с нанесенными пробами кДНК.

Достоинства SNP-маркеров являются в то же время и их недостатками. Невысокая информативность отдельного биаллельного SNP-локуса (Vignal et al., 2002) при-

Таблица 1

Сравнительная характеристика ДНК-маркеров с позиции их практического использования для идентификации осетровых рыб

Метод	Данные об идентификации (публикации)			Наличие контрольных образцов	Стоимость 1 анализа *	Продолжительность анализа
	видовой	популяционной	индивидуальной			
RFLP	+			Да (GenBank)	++	5 часов
RAPD	+			Да	+	1 день
AFLP	+			Да	++	1 день
SNP (mtDNA)	+			Да	+	1 день
Секвенирование	+	+		Да (EMBL, GenBank)	+++	1–2 дня
2-праймерная ПЦР (мтДНК)	+			Нет	+	3 часа
STR	+	+	+	Да (публикации)	++	5 часов

Примечание: * — предполагаемые затраты на исследование одного образца (+ — около 10 евр., ++ — 20 евр., +++ — более 20 евр.), включена только стоимость реактивов.

водит к необходимости использовать большой пул маркеров. Высокая плотность и особенности локализации в геноме требуют строгого отбора локусов на независимое наследование и селективную нейтральность. Для разработки и апробации SNP-маркеров необходимы значительные затраты времени и средств, что ограничивает их применение в области систематики и филогении.

На основании секвенсов участка митохондриального гена цитохрома b были разработаны SNP-маркеры для видовой дифференциации ряда осетровых видов (Rehbein, 1997). Неудобство метода заключается в необходимости постановки сложной системы нескольких ПЦР реакций на одну пробу ввиду амплификации только коротких ПЦР-фрагментов (обычно менее 250 пн). Однако, несмотря на это, метод использовали для матрилинейной идентификации близкородственных видов A. *baerii, A. gueldenstaedtii, A. naccarii* и *A. persicus* (Ludwig et al., 2000). Отметим, что разработка SNP-маркеров для большинства осетровых видов сегодня осложнена недостаточным количеством исследуемых выборок из природных популяций.

1.3.4. Анализ микросателлитной ДНК

Микросателлитные последовательности (STR — Short Tandem Repeats или SSR — Simple Sequence Repeats) относятся к умеренно повторяющейся (сателлитной) ядерной ДНК, широко распределенной по всему геному. В классе рыб микросателлитный локус встречается приблизительно на каждые 10 000 пн, тогда как минисателлитный локус — на каждые 1 500 000 пн (Wright, 1993). Один из вариантов классификации STR-локусов приведен в работе Уркхарта с соавт. (Urquhart et al., 1994). Разнообразие структуры STR-маркеров продемонстрировано во многих работах на осетровых рыбах (King et al., 2001; Zane et al., 2002; Welsh et al., 2003; Bork et al., 2008, Forlane et al., 2008). Например, некоторые локусы зеленого осетра *A. fulvescens* имеют аллели, состоящие из совершенных или простых повторов $(CATC)_n$, $(GATA)_n$, $(AAAC)_n$, $(CA)_n$: их регулярность не прерывается. Возникновение точковых мутаций приводит к более сложной структуре — $(GATA)_nGACA(GATA)_n$. Наконец, встречаются сложные аллели, составленные из двух и более типов повторов — $(AAAC)_6(AC)_2(AAAC)_8$ и т. д.

Консервативность фланкирующих последовательностей, на базе которых разрабатываются STR-праймеры, и сходство организации микросателлитов позволяют использовать одни и те же праймеры и протоколы анализа для близких видов, что, несомненно, является преимуществом метода (May et al., 1997; Zane et al., 2002). Однако вероятность мутации в сайтах праймеров приводит к феномену неамплифицируемого, так называемого, «нуль-аллеля», что может привести к фиксации ложной гомозиготности по данному локусу.

STR-маркеры относятся к рекомбинантным геномным селективно нейтральным маркерам, подчиняющимся законам наследования Менделя. Выявляемый с их помощью уровень ДНК полиморфизма на порядок выше аллозимной изменчивости (см. табл. 1, Алтухов и Салменкова, 2002). Такая существенная разница обусловлена большей скоростью возникновения мутаций в микросателлитных локусах, составляющей около 10^{-2}–10^{-6} на локус за поколение против 10^{-5}–10^{-6} у структурных генов (Schlötterer, 2000). Быстрое накопление популяционно-специфичных мутаций в STR-локусах, позволяет не только анализировать популяционную структуру вида, но и идентифицировать принадлежность отдельной особи к конкретной популяции (Hansen et al., 2001). Данные STR-анализа часто используют для оценки внутрипопуляционных процессов, таких как миграция, эффекты «горлышка бутылки» (Cornuet, Luikart, 1996; King, 2000).

На фоне медленной молекулярной эволюции в отряде *Acipenseriformes* высокий полиморфизм по STR-локусам обеспечивает успешное решение задач по

дискриминации близкородственных осетровых видов, например, *A. medirostris* и *A. transmontanus* (Bork et al., 2008). Для видовой идентификации севрюги *A. stellatus* был предложен микросателлитный локус Afu-39, который содержит аллель (111 пн), отсутствующий у 10-ти других видов осетров (Jenneckens et al., 2001). Однако анализ по Afu-39 оказался не применим для *A. baerii, A. gueldenstaedtii*, которые не амплифицировали ПЦР-продукт с предложенными праймерами.

Исследования внутригрупповой изменчивости нескольких десятков особей адриатического осетра *(A. naccarii)*, проведенные с помощью STR и митохондриальных маркеров (Zane et al., 2002), показали дифференцирование согласно географическому происхождению особей этого исчезающего вида. STR-анализ позволил дискриминировать адриатического и русского осетра, несмотря на наличие у нескольких особей *A. naccarii gueldenstaedtii*-подобных митотипов.

Смит с соавт. (Smith et al., 2002) на основании анализа STR-локусов, описанных для белого и атлантического осетра *(A. oxyrinchus)*, изучили популяционную структуру белого осетра *(A. transmontanus)* и выявили ее изменения, связанные с фрагментацией некогда единой популяции *A. transmontanus* вследствие строительства плотин. С помощью полиморфизма микросателлитных локусов была также успешно определена внутривидовая дифференциация североамериканского *A. fulvescens* (McQuown et al., 2003), *A. oxyrinchus* из Мексиканского залива (Dugo et al., 2004), понтокаспийского *A. gueldenstaedtii* (Тимошкина и др., 2009).

1.3.5. Анализ полиморфизма ядерных генов

Методы, основанные на сравнительном анализе первичной нуклеотидной последовательности ядерных генов (частичные и полные; интронов и экзонов) успешно используют в филогении животных. В случае с осетровыми рыбами секвенс-анализ по причине сложной организации ядерного генома (многохромосомность, различные уровни плоидности, микрохромосомы, дополнительные В хромосомы) имеет ряд ограничений. Наиболее изучен ядерный ген *18S rRNA*. Бирштейн с соавт. (Birstein et al., 1997) определили его частичную последовательность (230 пн) у восьми видов отряда и показали, что данный сегмент имеет небольшую разрешающую способность из-за низкой степени межвидовых различий. Дальнейшие исследования этого гена выявили у осетров необычное явление индивидуальной изменчивости (множество вариантов последовательности дуплицированного гена), что связывают с присутствием дополнительной ДНК в геноме хрящевых ганоидов из-за их полиплоидного происхождения (Krieger, Fuerst, 2002). В серии работ на *A. fulvescens* было проанализировано тридцать секвенсов гена *18S rRNA*, которые содержали 17 различных вариантов последовательностей, различавшихся индивидуальными нуклеотидными заменами и вставками/делециями. На филогенетическом древе, построенном по этим данным, осетры формировали монофилитическую ветвь, отдельную от веслоносов и/или других рыб. Однако эти последовательности оказались бесполезны для идентификации видов или межвидовых отношений (см. рис. 4 в Krieger, Fuerst, 2002). В более позднем исследовании (Krieger et al., 2006), внутрииндивидуальная изменчивость *18S rRNA* гена была найдена у 14 евразийских видов *Acipenseriformes*, но она отсутствовала у китайского веслоноса, что послужило основанием предполагать более раннее разделение семейств осетров и веслоносов.

Данные исследований уже 24-х видов *Acipenseriformes* по двум полиморфным сегментам гена *18S rRNA* не позволили провести филогенетический анализ. Однако отдельные мутации вставка/делеция, наблюдаемые в данных последовательностях, коррелировали с предположительными эволюционными отношениями видов. Например, *A. sturio* и *A. oxyrinchus* образовывала единую группу. Близкородственные отношения этих видов и подвидов *A. o. oxyrinchus* и *A. o. desotoi.* подтверждали присутствием/отсутствием уникальной последовательности, трех уникальных полиморфных сайтов и недостатком изменчивости по другому сайту, вариабельному для всех других видов *Acipenser* и *Huso* (Ludwig et al., 2001; Fontana et al., 2001; Krieger et al., 2008).

1.3.6. Анализ полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК)

Геном митохондрий животных изучен гораздо подробней ядерного, и этому есть объективные причины. Во-первых, размеры мтДНК не превышают 20 000 пн, необходимых для кодирования 37 генов (рис. 2). мтДНК весьма компактно организована, ее кодирующие гены не содержат интронов и разделены генами тРНК. Единственный некодирующий участок молекулы содержит регуляторные элементы, ответственные за репликацию и транскрипцию мтДНК, — это контрольный регион (CR — control region) или D-петля (D-Loop — Displacement Loop). Размер указанной области мтДНК в силу наличия тандемных повторов различной копийности может варьировать в значительных пределах, в том числе и у осетровых рыб (Водолажский и др., 2008).

Во-вторых, количество молекул митохондриальной ДНК варьирует от 2 до 10 000 копий на клетку, и это позволяет формально отнести мтДНК к повторяющейся. Ковалентно замкнутая молекула мтДНК более устойчива к внешним воздействиям, что в совокупности с многокопийностью дает хорошую возможность исследовать археологические и музейные образцы (Рынза и др., 2006; Garrido-Ramos et al., 2009).

В-третьих, митохондриальная ДНК эволюционирует в среднем гораздо быстрее, чем сопоставимые ядерные последовательности, и мутации в ней происходят от 6 до 17 раз чаще по сравнению с соответствующими генами ядерной

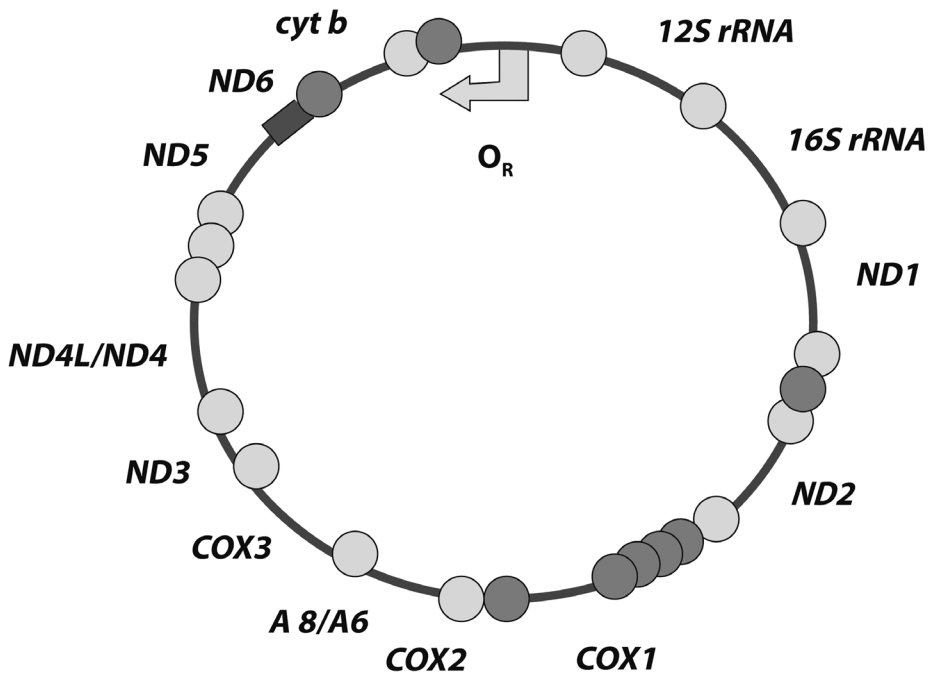

Рис. 2. Схема организации митохондриального генома. Обозначение генов: *A8/A6* кодируют субъединицы 6 и 8 АТФазы; *cyt-b* — цитохром b; *COX1–COX3* — субъединицы цитохром с-оксидазы; *ND1–ND6* — субъединицы НАДН-дегидрогеназного комплекса; *12S, 16S rRNA* — рибосомальные РНК; *ND4L* — часть субъединицы 4 НАДН-дегидрогеназы, транскрибируемой с легкой цепи; O_R — точка начала репликации; светлыми кружками обозначены гены транспортных РНК **(тРНК)**, транскрибируемые по часовой стрелке и темными кружками — тРНК, транскрибируемые против часовой стрелки

ДНК (Brown et al., 1986). Скорость накопления мутаций самой мтДНК различается для разных областей молекулы. Более высокий уровень изменчивости в некодирующем регионе D-петли определяется наличием повторов либо точечных мутаций (Roe et a1., 1985). Однако сама область контрольного региона неоднородна по этому показателю (Douzery, Randi, 1997; Saccone et a1., 1991).

Наиболее часто исследования митохондриального генома проводят прямым секвенированием. Для скрининговых исследований применяют рестрикционный анализ и специфичную дву-праймерную ПЦР.

Следует заметить, что митохондриальные гены не подчиняются законам Менделя и наследуются у большинства организмов, размножающихся половым путем, только по материнской линии (матрилинейно), и не подвергаясь рекомбинации. В связи с этим анализ мтДНК не позволяет провести индивидуализирующее исследование, но дает возможность идентифицировать определенный матрилинейный ряд.

Несмотря на то, что молекула мтДНК содержит различные гены, с позиции классической генетики она рассматривается как один локус, а гаплотипы мтДНК — как аллели этого локуса (Алтухов, 2003). Соответственно и эффективный размер популяции для мтДНК составляет только ¼ от аналогичной оценки для ядерных генов (Nei, Tajima, 1981). Поэтому при резком сокращении численности популяции анализ изменчивости мтДНК может раньше выявлять эффекты случайного дрейфа генов и «горлышка бутылки». Кроме того, следы этих процессов, а также изоляции популяции, имевшей место в прошлом, сохраняются в мтДНК на протяжении более длительного периода по сравнению с ядерной ДНК.

Важная особенность анализа мтДНК выделяет его по сравнению с аллозимными и полилокусными ДНК маркерами, а именно, митотипы можно выстраивать в сеть последовательных эволюционных шагов через минимальные числа пошаговых мутаций, необходимых для перехода от одного митотипа к другому. Сегодня уже разработаны многочисленные компьютерные программы, позволяющие на основе сравнения первичных последовательностей мтДНК реконструировать направления филогенеза (Mega, Paup, Arlequin).

В исследованиях осетровых рыб полиморфизм мтДНК чаще всего используют для видовой дифференциации и филогении. Для этих целей наиболее изучены области D-петли и гена цитохрома b (Birstein et al., 2000; Walsh et al., 2001; Корниенко и др., 2003; Doukakis et al., 2005; Мюге и др., 2008). Исследование малочисленного вымирающего коротконосого осетра *A. brevirostrum* продемонстрировало высокую популяционную структурированность этого анадромного вида, обитающего в реках восточного побережья Северной Америки. Причем достоверные меж-

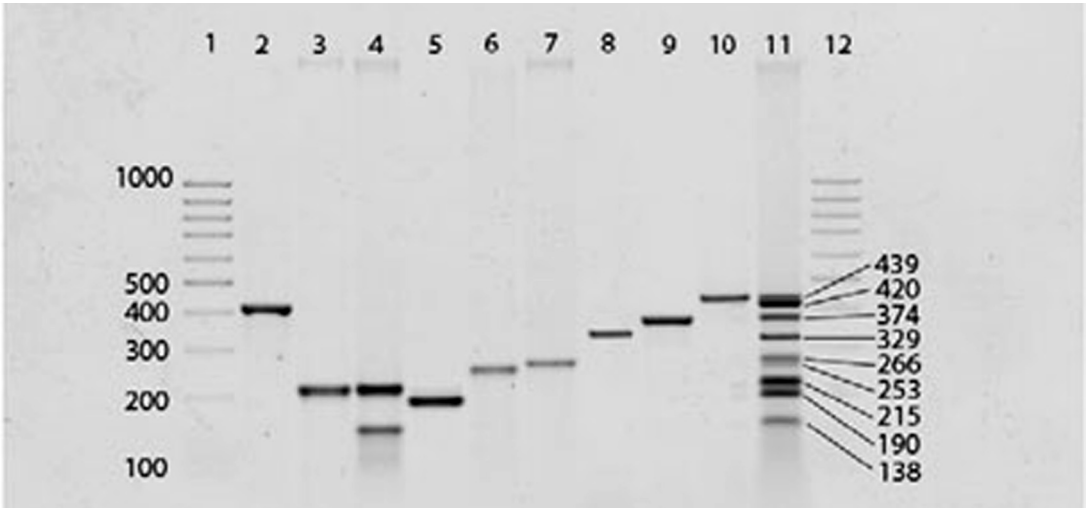

Рис. 3. Визуализация ПЦР-продуктов для разных видов осетров в агарозном геле (Мюге и др., 2008). На дорожках 1–12 — маркеры молекулярной массы ДНК; 2, 3 — *A. gueldenstaedtii*; 4 — *A. baerii*; 5 — *A. ruthenus*; 6 — *A. schrenckii*; 7 — *A. stellatus*, 8 — *A. nudiventris*; 9 — *H. huso*; 10 — *H. dauricus*, 11 — маркер масс ПЦР-продуктов осетровых

популяционные отличия на высоком уровне значимости были определены по секвенсам D-петли, в то время как морфологический анализ 11 признаков не показал дифференциации популяций (Walsh et al., 2001). Исследования первичной последовательности гена цитохрома b русского осетра продемонстрировали высокий полиморфизм азовской популяции — 8 митотипов у 24-х особей (Корниенко и др., 2003). В работе Водолажского и др. (2008) показана сложная структура D-петли *A. gueldenstaedtii*, где присутствуют как минимум TAS-1 и TAS-2 последовательности (Termination Associated Sequence — ассоциированная с терминацией репликации последовательность), причем количество TAS-2 последовательностей пропорционально количеству тандемных повторов. Тандемные повторы D-петли у разных видов осетровых рыб имеют протяженность от 74 до 83 пн, часто высокополиморфны, количественно варьируют не только между особями, но и в разных тканях одной особи (гетероплазмия) (Ludwig et al., 2000; Водолажский и др., 2008).

Видоспецифичную двухпраймерную ПЦР, основанную на присутствии диагностических нуклеотидных различий в последовательности мтДНК, успешно использовали для идентификации *H. huso, A. stellatus* и *A. gueldenstaedtii* (Birstein et al., 1998). Для каждого из этих видов, по крайней мере, одна пара специфичных праймеров, соответствовала диагностическим нуклеотидам. Т. е. появление продукта амплификации в реакции с одной из видоспецифичных пар праймеров, позволяет идентифицировать эти виды. Возможность выделения мтДНК из продуктов переработки осетровых (балык, икра и т. п.), простота исполнения, дешевизна и быстрота анализа обеспечили широкое применение данного метода в контроле над торговлей осетровыми рыбами. В случае, сомнительных результатов видоспецифичной ПЦР необходимо проведение дополнительного секвенирования фрагмента контрольного региона. Однако в более поздней работе этой группы исследователей было показано, что разработанный метод из-за перекрывания профилей мтДНК не позволил точно идентифицировать *A. gueldenstaedtii* и дифференцировать этот вид от близко родственных видов *A. baerii, A. naccarii* и *A. persicus* (Ludwig et al., 2002; Birstein et al., 2000). Недавнее определение полной последовательности мтДНК понтокаспийских видов осетровых (Rastorguev et al., 2008) позволяет значительно расширить возможности методов, основанных на митохондриальных маркерах. Например, в указанной работе была дана оценка разрешающей способности различных областей митохондриального генома для видовой и популяционной идентификации. Эти же авторы, исследуя полиморфизм нуклеотидной последовательности D-петли мтДНК осетровых рыб *(A. gueldenstaedtii, A. persicus, A. baerii, A. ruthenus, A. schrenckii, A. stellatus, A. nudiventris, H. huso, H. dauricus)*, разработали тест-систему, которая позволяет идентифицировать восемь из девяти изученных видов (рис. 3). Предлагаемый метод не дискриминирует только русского и персидского осетров, которые обнаруживают в большой степени гомологичные митохондриальные гаплотипы (Мюге и др., 2008).

1.4. КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ

Полиплоидность, многохромосомность, сравнительно медленная скорость эволюции структурных генов осетровых рыб не позволяют отдать предпочтение одному виду ДНК-маркеров. Для увеличения достоверности

результатов исследований генетической дифференциации *Acipenseriformes* часто используют ядерные и митохондриальные маркеры в комплексе. Например, анализ высоко полиморфных RAPD-маркеров не выявил различий между тремя географически изолированными популяциями *A. gueldenstaedtii*, одновременно достоверная внутривидовая дифференциация была обнаружена с помощью STR-маркеров и диагностического митотипа (Тимошкина и др., 2009).

Несколько работ было выполнено по определению популяционной структуры малочисленного *A. naccarii* из реки По и Буна с помощью маркеров митохондриальной (D-петля) и ядерной ДНК (STR и AFLP). Предварительное сообщение о видоспецифичной замене в D-петле, которая дискриминировала два экземпляра *A. naccarii* (река По) от *A. gueldenstaedtii* (Birstein et al., 2000), не было подтверждено в более позднем исследовании (Ludwig et al., 2003). Однако особи *A. naccarii* из реки Буна были легко идентифицированы по 13 диагностическим заменам в D-петле, одной замене в гене цитохрома b мтДНК и нескольким STR-аллелям, а так же по частоте AFLP-маркеров (Ludwig et al., 2002, Ludwig et al., 2003).

Показательны результаты работ, обнаруживших события гибридизации и интрогрессии у нескольких видов осетровых рыб. По данным Трана с соавт. (Tranah et al., 2004), крупномасштабные события межвидовой гибридизации имели место в трех популяциях *S. albus* и *S. platorynchus*. Основываясь на частичной последовательности гена цитохрома b, Бирштейн с соавт. (Birstein et al., 1998) высказали предположение о гибридной природе значительной части каспийской популяции русского осетра, так как обнаруженный у 30 % особей митотип характеризовался высокой гомологией с мтДНК сибирского осетра *A. baerii* (Jenneckens et al., 2000). Однако последовавший вывод о недавнем появлении этого митотипа вследствие межвидового скрещивания при искусственном воспроизводстве не подтвердили в дальнейшем AFLP и STR-анализ указанных видов, который не выявил подобного сходства между русским осетром с «baerii-like» митотипом и сибирским осетром. Дальнейшие исследования единичных нуклеотидных замен D-петли показали неидентичность митотипов сибирского осетра и «baerii-like» митотипа русского осетра (Мюге и др., 2008). По данным Тимошкиной и др. (2009) и Войновой и др. (Voynova et al., 2008), «baerii-like» митотип является диагностическим маркером для каспийской популяции *A. gueldenstaedtii*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературы свидетельствует, что ДНК-маркеры чаще используют для разработки методов видовой идентификации осетровых рыб (табл. 1). Тем не менее, наиболее информативными для дискриминации видов являются метод секвенирования мтДНК и разработанные на его основе двупраймерная ПЦР и RFLP. STR-анализ более востребован для популяционной и индивидуальной идентификации.

Во многих работах последнего десятилетия для оценки генетического полиморфизма осетровых рыб из-за методических трудностей, связанных с полиплоидией и сложной организацией ядерного генома, авторы отдают предпочтение митохондриальной ДНК. Полученные данные дают возможность реконструировать генеалогию соответствующих митотипов, позволяют восстанавливать картину расселения, изоляции и гибридизации видов и популяций. Однако матрилинейный характер наследования маркеров мтДНК не позволяет проводить индивидуализирующий анализ особей, контролировать межвидовую гибридизацию в условиях аквакультуры, а также определять уровень плоидности.

Более медленная молекулярная эволюция осетровых видов, по сравнению с костистыми рыбами определяет проблему предела разрешающей способности метода секвенирования структурных генов, ограничивая генетическое дифференцирование и его количественное определение. Именно по этим причинам идет активная разработка для *Acipenseriformes* новых маркеров микросателлитной ДНК, демонстрирующих чрезвычайно высокий уровень полиморфизма. Использование системы STR-маркеров дает возможность решить вопросы индивидуальной идентификации и популяционной принадлежности особей, оценки эффективности искусственного воспроизводства через определение репродуктивного вклада производителей в генофонд жизнеспособного потомства. Перспективность STR-анализа побудила к поиску микросателлитных локусов с диплоидным типом наследования у полиплоидных по своей природе осетровых видов.

Таким образом, использование ДНК маркеров в течение последнего десятилетия позволило определить внутривидовую дифференциацию многих видов отряда *Acipenseriformes*, что имеет большое значение для планированного вылова, искусственного размножения и в конечном итоге сохранения этих древних рыб.

Литература

1. *Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А.,* 2002. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. Т. 38. № 9. С. 1173–1195.
2. *Алтухов Ю. П.,* 2003. Генетические процессы в популяциях. М. : ИКЦ «Академкнига». 431с.
3. *Артюхин Е. Н.,* 2008. Осетровые (экология, географическое распространение и филогения). СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та. 137 с.
4. *Бабурина Е. А.,* 1957. Развитие глаз и их функции у осетра и севрюги // Труды института морфологии животных. Вып. 20. С. 148–186.

5. *Берг Л. С.,* 1948. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. М.-Л. : Изд-во АН СССР. Ч. 1. 467 с.
6. *Васильев В. П.,* 1985. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука. 300 с.
7. *Водолажский Д. И., Конриенко И. В., Войнова Н. В.,* 2008. Гипервариабельность региона D-петли митохондриальной ДНК русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii (Acipenseriformes, Acipenseridae)* // Вопр. ихтиологии. Т. 48. С. 266–275.
8. *Галь Э., Медеши Г., Верецкеи Л.* 1982. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир. 448 с.
9. *Животовский Л. А.,* 2006. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Вестник ВОГиС. Т. 10. № 1. С. 74–96.
10. *Зеленина Д. А., Хрусталева А. М., Волков А. А.,* 2006. Сравнительное исследование популяционной структуры и определение популяционной принадлежности нерки *(Oncorhynchus nerka)* Западной Камчатки с помощью RAPD-PCR и анализа полиморфизма микросателлитных локусов // Генетика. Т. 42. С. 693–704.
11. *Калмыков В. А., Рубан Г. И., Павлов Д. С.,* 2009. О популяционной структуре стерляди *Acipenser ruthenus (Acipenseridae)* из нижнего течения Волги // Вопр. ихтиологии. Т. 49. С. 380–388.
12. *Корниенко И. В., Войнова Н. В., Чистяков В. А. и др.,* 2003. Полиморфизм первичной последовательности сегмента гена цитохрома и митохондриальной ДНК азовской популяции *Acipenser gueldenstaedtii* // Вопр. ихтиологии. Т. 43. С. 73–77.
13. *Кузьмин Ю. В.,* 1991. Сравнительное исследование аллозимов мышечной малат дегидрогеназы в популяциях сибирского осетра *Acipenser baeri* р. Обь и стерляди *A. ruthenus* р. Дон и Камы // Вопр. ихтиологии. Т. 31. С. 139–144.
14. *Левонтин Р. С.,* 1978. Генетические основы эволюции. М.: Мир. 351 с.
15. *Лукьяненко В. И., Гераскин П. П., Баль Н. В.,* 1977. Гетерогенность и полиморфизм гемоглобина у двух видов рода *Huso* // Докл. АН СССР. Т. 237. С. 994–997.
16. *Лукьяненко В. И., Лукьяненко В. В., Хабаров Н. В.,* 2002. Гетерогенность и полиморфизм функционально специализированных белков крови мигрирующих рыб на примере северо-каспийской популяции русского осетра во время морского и речного периодов жизни. 2. Гемоглобины // Докл. РАН. Сер. Биология. № 4. С. 494–500.
17. *Мюге Н. С., Барминцева А. Е., Расторгуев С. М. и др.,* 2008. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика. Т. 44. С. 1–7.
18. *Подушка С. Б.,* 2003. О систематическом положении азовского осетра // Научно-технический бюллетень лаборатории ихтиологии ИНЭНКО. СПб. № 7. С. 19–44.
19. *Подушка С. Б.,* 2007. Сводка данных по биологии, промыслу и воспроизводству азовской белуги // Научно-технический бюллетень лаборатории ихтиологии ИНЭНКО. СПб. № 12. С. 16–73.
20. *Рожкован К. В., Челомина Г. Н., Рачек Е. И.,* 2008. Молекулярная идентификация и особенности генетического разнообразия межвидовых гибридов амурского осетра (*Acipenser schrenckii* × *A. baerii, A. baerii* × *A. schrenckii, A. schrenckii* × *A. ruthenus* и *A. ruthenus* × *A. schreckii*) по данным измечивости мультилокусных RAPD-маркеров // Генетика. Т. 44. С. 1453–1460.
21. *Рынза Е. Т., Тимошкина Н. Н., Мухоньков М. М.,* 2006. Видовая идентификация археологического материала осетровых рыб с помощью метода полимеразной цепной реакции // Сб. науч. тр. АзНИИРХ. Ростов-на-Дону: «МедиаПресс». С. 289–292.
22. *Рябова Г. Д., Климонов В. О., Шишанова Е. И.* 2008. Генетическая изменчивость природных популяций и доместицированных стад осетровых России (атлас аллозимов). М: Россельхозакадемия. 94 с.
23. *Рябова Г. Д., Офицеров М. В., Шишанова Е. И.,* 1995. Исследование связи между аллозимной изменчивостью и некоторыми компонентами приспособленности у севрюги *Acipenser stellatus (Pallas)* // Генетика. Т. 31. С. 1679–1692.
24. *Тимошкина Н. Н., Барминцева А. Е., Усатов А. В., Мюге Н. С.,* 2009. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра *(Acipenser gueldenstaedtii)* // Генетика. Т. 45. № 9. С. 1250–1259.
25. *Тимошкина Н. Н., Рынза Е. Т., Усатов А. В.,* 2007. ДНК–идентификация «baerii-like» митотипа в азовской популяции русского осетра *(Acipenser gueldenstaedtii)* // Сб. науч. тр. Съезда Украинского общества генетиков и селекционеров. Киев: Логос. Т. 1. С. 326–329.
26. *Цветненко Ю. Б.,* 1993. Эффективность и генетические последствия интродукции севрюги *Acipenser stellatus* из Каспийского в Азовский бассейн // Вопр. ихтиологии. Т. 33. С. 382–387.
27. *Чихачев А. С., Цветненко Ю. Б.,* 1984. Оценка влияния искусственного воспроизводства и интродукции на генетическую структуру популяции азовских осетровых // Воспроизводство рыбных запасов Каспийского и Азовского морей. М.: ВНИРО. С. 114–125.
28. *Шляхов В. А.,* 1994. Оценка численности днепровского стада осетра в северо-западной части Черного моря // Труды ЮгНИРО. Керчь. Т. 40. С. 50–55.
29. *Barmintsev V. A., Chudinov O. S., Abramova A. B.,* 2001. Molecular and biological methods of identification and certification of sturgeons and their products // Fish Farm. Fish. Vol. 1. P. 70–71.

30. *Birstein V. J., Doukakis P., DeSalle R.,* 2000. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, Acipenser gueldenstaedtii: forensic and evolutionary implications // Cons. Gen. Vol. 1. P. 81–88.
31. *Birstein V. J., Doukakis P., Sorkin B., DeSalle R.,* 1998. Population aggregation analysis of three caviar-producing species of sturgeons and implications for the species identification of black caviar // Conserv. Biol. Vol. 12. P. 766–775.
32. *Birstein V. J., Hanner R., DeSalle R.,* 1997. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches // Environ Biol Fish. Vol. 48. P. 127–155.
33. *Birstein V. J., Poletav A. I., Goncharov B. F.,* 1993. The DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry // Cytometry. Vol. 14. P. 377–383.
34. *Bork K., Drauch A., Israel J. A. et al.* 2008. Development of new microsatellite primers for green and white sturgeon // Conserv. Genet. Vol. 9. P. 973–979.
35. *Brown J. R., Beckenbach K., Beckenbach A. T., Smith M. J.,* 1996. Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (Acipenser) // Genetics. Vol. 142. P. 525–535.
36. *Brown G., Gadaleta G., Pepe G., Saccone C. and Sbisà E.,* 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA // J. Mol. Biol. Vol. 192. P. 503–511.
37. *Comincini S., Lanfredi M., Rossi R., Fontana F.,* 1998. Use of RAPD markers to determine the genetic relationships among sturgeons (*Acipenseridae, Pisces*) // Fish. Sci. Vol. 64. P. 35–38.
38. *Congiu L., Fontana F., Patarnello T., Rossi R., Zane L.,* 2002. The use of AFLP in sturgeon identification // J. Appl. Icht. Vol. 18. P. 268–289.
39. *Cornuet J. M., Luikart G.,* 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data // Genetics. Vol. 144. P. 2001–2014.
40. *De la Herra R., Robles F., Martinez-Espin E.,* 2004. Genetic identification of western Mediterranean sturgeons and its implication for conservation // Conser. Genetics. Vol. 5. P. 545–551.
41. *Debus L., Winkler M., Billard R.,* 2002. Structure of micropyle surface on oocytes and caviar grains in sturgeons // Int. Rev. Hydrobiol. Vol. 87. P. 585–603.
42. *Doukakis P., Birstein V. J., De Salle R.,* 2005. Intraspecific structure within three caviar-producing sturgeons *(Acipenser gueldenstaedtii, A. stellatus and Huso huso)* based on mitochondrial DNA analysis // J. Appl. Icht. Vol. 21. P. 457–460.
43. *Dugo M. A., Kreiser B. R., Ross S. T. et al.,* 2004. Conservation and managmitnt implications of fine-scale genetic structure of Gulf sturgeon in the Pascagoula River, Mississippi // J. Appl. Icht. Vol. 20. P. 243–251.
44. *Douzery E., Randi E.,* 1997. The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content // Mol. Biol. and Evol. Vol. 14. P. 1154–1166.
45. *Fontana F., Tagliavini J., Congiu L.,* 2001. Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives // Genetica. Vol. 111. P. 359–373.
46. *Forlani A., Fontana F., Congiu L.,* 2008. Isolation of microsatellite loci from the endemic and endangered Adriatic sturgeon *(Acipenser naccarii)* // Conserv. Genet. Vol. 9. P. 461–463.
47. *Garrido-Ramos M. A., Robles F., de la Herran R. et al.,* 2009. Analysis of Mitochondrial and Nuclear DNA Markers in Old Museum Sturgeons Yield Insights About the Species Existing in Western Europe: A. *sturio, A. naccarii and A. oxyrinchus* // Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons / Eds. R. Carmona et al.: Springer Science + Business Media B. Vol. P. 25–49.
48. *Gharaei A., Pourkazemi M., Rezvani S., Mojazi Amiri B.,* 2005. Genetic differences; and resemblance between *Acipenser persicus* and *Acipenser gueldenstaedtii* by means of RAPD technique // Iran. Sci. Fish. J. Vol. 14. P. 91–102.
49. *Hansen M., Kenchington E., Nielsen E. E.,* 2001. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers // Fish and Fisheries. Vol. 2. P. 93–112.
50. *Jenneckens I., Meyer J.-N., Debus L. et al.,* 2000. Evidence of mitochondrial DNA clones of S*iberian sturgeon, Acipenser baerii,* within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii,* caught in the River Volga // Ecol. Lett. Vol. 3. P. 503–508.
51. *Jenneckens I., Meyer J. N., Horstgen-Schwark G. et al.,* 2001. A fixed allele at microsatellite LS-39 is characteristic for the black caviar producer *Acipenser stellatus* // J. Appl. Icht. Vol. 17. P 39–42.
52. *Keyvanshokooh S., Pourkazemi M., Katbassi M. R.,* 2007. The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga *(Huso huso)* // J. Appl. Icht. Vol. 23. P. 1–2.
53. *King J. P., Kimmel M., Chakraborty R.,* 2000. A power analysis of microsatellite-based statistics for inferring past population growth // Mol. Biol. and EVol. Vol. 17. P. 1859–1868.
54. *King T. L., Lubinski B. A., Spidle A. P.,* 2001. Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon *(Acipenser oxyrinchus oxyrinchus)* and cross-species amplification in the *Acipenseridae* // Cons. Gen. Vol. 2. P. 103–119.
55. *Krieger J., Fuerst P. A.,* 2002. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order *Acipenseriformes* // Mol. Biol. Evol. Vol. 19. N 6. P. 891–897.
56. *Krieger J., Hett A. K., Fuerst P. A. et al.,* 2006. Unusual intraindividual variation of the nuclear *18S rRNA* gene is widespread within the *Acipenseridae* // J. Hered. Vol. 97. P. 218–225.

57. *Krieger J., Hett A. K., Fuerst P. A., Artyukhin E., Ludwig A.,* 2008. The molecular phylogeny of the order *Acipenseriformes* revisited // J. Appl. Icht. Vol. 24. P. 36–45.
58. *Kynard B., Zhuang P., Zhang L., Zhang T., Zhang Z.,* 2002. Ontogenetic behavior and migration of Volga River Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii,* with a note on adaptive significance of body color // Environmental Biology of Fishe. Vol. 65. P. 411–421.
59. *Lansman R. A., Shade R. O., Shapiro J. F., Avise J. C.,* 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations III. Techniques and potential applications // J. Mol. EVol. Vol. 17. P. 214–226.
60. *Ludwig A., May B., Debus L., Jenneckens I.,* 2000. Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon *(Acipenser, Huso and Scaphirhynchus)* // Genetics. Vol. 156. P. 1933–1947.
61. *Ludwig A., Belfiore N. M., Pitra C. et al.,* 2001. Genome duplication events and functionfl reduction of ploidy levels in sturgeon *(Acipenser, Huso and Scaphirhynchus)* // Genetics. Vol. 158. P. 1203–1215.
62. *Ludwig A., Debus L., Jenneckens I.,* 2002. A molecular approach for trading control of black caviar // Int. Rev. Hydrobiol. Vol. 87. P. 661–674.
63. *Ludwig A., Congiu L., Pitra C. et al.,* 2003. Nonconcordant evolutionary history of maternal and paternal lineages in Adriatic sturgeon // Mol. Ecol. Vol. 12. P. 3253–3264.
64. *May B., Krueger C. C., Kincaid H. L.,* 1997. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus* // Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 54. P. 1542–1547.
65. *McQuown E., Gall G. A. E., May B.,* 2002. Characterization and inheritance of six microsatellite loci in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) // Trans. Am. Fish. Soc. Vol. 131. P. 299–307.
66. *McQuown E., Krueger C. C., Kincaid H. L. et al.,* 2003. Genetic comparison of lake sturgeon populations: Differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite loce // F. Great. Lakis Res. Vol. 29. N 1. P. 3–13.
67. *Mueller U. G., Wolfenbarger L. L.,* 1999. AFLP genotyping and fingerprinting // Trends Ecol. Evol. Vol. 14. P. 389–394.
68. *Nei M., Tadjima F.,* 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases // Genetics. Vol. 105. P. 207–217.
69. *Pyatskowit J. D., Krueger C. C., Kincaid H. L., May B.,* 2001. Inheritance of microsatellite loci in the polyploid derivative lake sturgeon *(Acipenser fulvescens)* // Genome. Vol. 44. P. 185–191.
70. *Rastorguev S., Mugue N., Volkov A., Barmintsev V.,* 2008. Complete mitochondrial DNA sequence analysis of Ponto-Caspian sturgeon species // J. Appl. Icht. Vol. 24. P. 46–49.
71. *Raymakers C.,* 2006. CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: its role in the conservation of *Acipenseriformes* // J. Appl. Icht. Vol. 22. P. 53–65.
72. *Rehbein H.,* 1997. Fischartbestimmung von Caviar durch Proteinund DNA-Analyse // Info. Fischw. Vol. 44. P. 27–30.
73. *Rodzen J. A., Famula T. R., May B.,* 2004. Estimation of parentage and relatedness in the polyploid white sturgeon *(Acipenser transmontanus)* using a dominant marker approach for duplicated microsatellite loci // Aquaculture. Vol. 232. P. 165–182.
74. *Roe B. A., Ma D. P., Wilson R. K., Wong J. F.,* 1985. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome // J. Biol. Chem. Vol. 260. P. 9759–9774.
75. *Saccone C., Pesole G., Sbisa E.,* 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure–function model and evolutionary pattern // J. Mol. EVol. Vol. 33. P. 83–91.
76. *Saiki R. K., Scharf S., Faloona F. et al.,* 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Science. Dec. 20. Vol. 230. P. 1350–1354.
77. *Schlötterer C.,* 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA // Chromosoma. V. 109. P. 365– 371.
78. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.,* 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Ibid. Vol. 74. P. 5463–5467.
79. *Smith P., McVeagh M.,* 2000. Allozyme and microsatellite DNA markers of toothfish population structure in the Southern Ocean // J. Fish Biol. Vol. 57. P. 72–83.
80. *Smith C. T., Nelson R. J., Pollard S. et al.,* 2002. Population genetic analysis of white sturgeon *(Acipenser transmontanus)* in the Fraser River // J. Appl. Icht. Vol. 18. P. 307–312.
81. *Tranah G., Campton D. E., May B.,* 2004. Genetic evidence for hybridization of pallid and shovelnose sturgeon // Heredity. Vol. 95. P. 474–480.
82. *Urquhart A., Kimpton C. P., Downes T. J., Gill P.,* 1994. Variation in short tandem repeat sequences — a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers // Int. J. Leg. Med. Vol. 107. P. 13–20.
83. *Van Eenennaam A. L., Murray J. D., Medrano J. F.* 1998. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson (Pisces, Asipenseridae), a fish with a very high chromosome number // Genome. Vol. 41. P. 51–61.
84. *Vasil'ev V. P.,* 2009. Mechanisms of Polyploid Evolution in Fish: Polyploidy in Sturgeons // Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons / Eds. R. Carmona et al.: Springer Science + Business Media B. Vol. P. 97–117.

85. *Vecsei P., Charette R., Hochleithner M. et al.,* 2004. 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. P. 30–33.
86. *Vignal A., Milan D., San Cristobal M., Eggen A.,* 2002. A review of SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics // Genet. Sel. Emol. Vol. 34. P. 275–305.
87. *Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al.* 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucleic Acids Res. Vol. 23. P. 4407–4414.
88. *Voynova N. V., Mirzoyan A. V., Timoshkina N. N., Rynza E. T.,* 2008. Occurrence of non-native specimens of Caspian origin within the Sea of Azov population of the Russian sturgeon *(Acipenser gueldenstaedtii)* // J. Appl. Icht. Vol. 24. P. 50–51.
89. *Welsh A. B., Blumberg M., May B.,* 2003. Identfication of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipernser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* // Mol. Ecol. Notes. Vol. 3. P. 47–55.
90. *Walsh M. G., Bain M. B., Squiers T., Waldman J. R., Wirgin I.* 2001. Morphological and genetic variation among Shortnose Sturgeon *Acipenser brevirostrum* from Adjacent and Distant Rivers // Estuaries. Vol. 24. P. 41–48.
91. *Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G.,* 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods and applications // 2nd ed. Taylor and Francis Group. 338 p.
92. *Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski F. A., Tingey S. V.* 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers // Methods Enzymol. Vol. 218. P. 704–740.
93. *Wright J. M.,* 1993. DNA fingerprinting in fishes // Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Vol. 2. / In Hochachka P. W. and Mommsen T. eds. Amsterdam: Elsevier. P. 58–91.
94. *Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al.,* 2002. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon *(Acipenser naccarii)* //Mol. Ecol. Not. Vol. 2. P. 586–588.
95. *Zhivotovsky L. A.,* 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers // Molecular Ecology. Vol. 8. P. 907–913.
96. *Zhivotovsky L. A., M. W. Feldman,* 1995. Microsatellite variability and genetic distances // Proc. Natl. Acad Sci. USA. Vol. 92. P. 11549–11552.

MOLECULAR-GENETIC MARKERS IN STUDY OF INTRA- AND INTERSPECIFIC POLYMORPHISM OF ACIPENSERIFORMES

N. N. Timoshkina, D. I. Vodolazhski, A. V. Usatov

❀ **SUMMARY: Uniqueness and high commercial value of relic group of sturgeon fishes stimulated researches of their genetic polymorphism. In the review the basic molekular-genetic markers used for an estimation of genetic variability are considered; their merits and demerits are discussed, examples of their application, basically, on** *Acipenseriformes* **Eurasia are resulted. Problems of the genetic analysis polyploid kinds are is short covered**

❀ **KEY WORDS:** genetic polymorphism; polyploidy; molecular genetic markers.

❀ Информация об авторах

Тимошкина Наталья Николаевна — научный сотрудник.
Южный научный центр РАН.
344006, Ростов-на-Дону, ул. Чехова 41.
E-mail: n_timoshkina@mail.ru

Водолажский Дмитрий Игорьевич — ведущий научный сотрудник.
Южный научный центр РАН.
344006, Ростов-на-Дону, ул. Чехова 41.
E-mail: vodolazhski@mmbi.krinc.ru

Усатов Александр Вячеславович — профессор, д. б. н.
Южный Федеральный университет.
344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая 105.
E-mail: usatova@mail.ru

Timoshkina Natalya N. — Southern Scientific Center of Russian Academy of Sciences (SSC RAS), st. Chehova, 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia
E-mail: n_timoshkina@mail.ru

Vodolazshky Dmitry Ig. — Southern Scientific Center of Russian Academy of Sciences (SSC RAS), st. Chehova, 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia
e-mail: vodolazhki@mmbi.krinc.ru

Usatov Alexandr V. — professor. Southern Federal University, st. B. Sadovay, 105, Rostov-on-Don, 344006 Russia
e-mail: usatova@mail.ru