Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»

На правах рукописи

Сергеев Алексей Алексеевич

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ РУССКОГО ОСЕТРА ACIPENSER GUELDENSTAEDTII BRANDT, 1833

03.02.06 – ихтиология 03.02.07 – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители: доктор биологических наук Глубоковский М.К., кандидат биологических наук Мюге Н.С.

Оглавление

ВВЕДЕ	НИЕ	4
ГЛАВА	1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1.	Положение Осетрообразных в пределах системы рыб	11
1.2.	Систематика и эволюционные отношения видов внутри отряда Acipenseriformes	12
1.3.	Генетические особенности осетровых рыб	13
1.4.	Группы осетровых видов рыб по уровню плоидности	14
1.5.	Исследования популяционной и нерестовой структуры	16
pyce	ского осетра	16
1.6.	История вопроса персидского осетра	21
1.7.	Молекулярно-генетические исследования понто-каспийских осетровых	27
ГЛАВА	2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	32
2.1.	Сбор материалов	32
2.2.	Морфометрическое исследование персидских и русских осетров	35
2.3.	Выделение ДНК	37
2.4.	Тест на митотипы GUE, BAE, BL	37
2.5.	Метод AFLP	39
2.6.	Анализ однонуклеотидного полиморфизма	43
2.7.	Секвенирование контрольного региона мтДНК (D-петли)	49
2.8.	Проведение микросателлитного анализа	50
2.9.	Статистическая обработка результатов генетического мониторинга молоди осетровых	52
ГЛАВА	х 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	53
3.1. Ге	енетический полиморфизм ремонтно-маточных стад волжских ОРЗ	53
	олиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК русских, персидских и сибирских ов на основании сравнения частот митотипов ВАЕ, GUE и BL	56
	ежвидовая и межпопуляционная дифференциация русского, персидского и сибирского осетров ании анализа AFLP локусов ядерной ДНК	
	оответствие морфологической и генетической дифференциации выборок осетров персидского в ого морфотипов из северной части Каспийского моря	
	ежвидовая и межпопуляционная дифференциация русского, персидского и сибирского осетров ании анализа однонуклеотидного полиморфизма ядерных локусов ДНК	
	овременное состояние популяции русского осетра реки Волги на основании данных генетическ оринга морских и речных выловов сеголетков	
ГЛАВА	4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	91
ЗАКЛК	ОЧЕНИЕ	95
выво	ды	96

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98
Приложение А	117
Приложение Б	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833) – представитель отряда осетрообразных (Acipenseriformes) – является одним из самых ценных аквакультурных и в прошлом промысловых объектов ихтиофауны нашей страны. В настоящее время вследствие браконьерского вылова и антропогенного воздействия на среду обитания размеры природных популяций русского осетра и других осетровых видов резко сократились (Рубан, 1999; Ходоревская, 2002; Калмыков, Рубан, Павлов, 2009). Виды, входящие в отряд, объявлены редкими и включены в Приложение II СІТЕС (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (Raymakers, 2006).

Для осуществления эффективных мер по сохранению природных запасов русского осетра необходим широкий спектр научных знаний как о сложной популяционной структуре и генетических особенностях вида, так и об эффективности сложившейся системы искусственного поддержания численности данного вида в дикой природе.

При описании популяционной структуры вида в настоящее время применяются комплексные подходы, учитывающие целый как морфологических и экологических особенностей вида, так и генетических молекулярно-генетическими характеристик, выявляемых методами (Животовский, 1984; Алтухов, 2003).

Изучение особенностей генофонда русского осетра может дать новые сведения не только о популяционной структуре и филогенетических связях вида, но и помочь в решении практических задач. Вплоть до настоящего времени полностью не решена проблема идентификации особей данной группы осетровых и продукции из них. Поиск новых информативных генетических маркеров попрежнему остается актуальным, так как найденные в настоящее время

генетические маркеры позволяют решать данные задачи лишь частично (Birstein et al., 2005; Krieger et al., 2008; Мюге и др., 2008; Барминцева, Мюге, 2013).

Степень разработанности темы

В настоящее время в популяционно-генетических и филогенетических широкое применение исследованиях получило использование маркеров митохондриальной ДНК (мтДНК). Применяются и активно разрабатываются молекулярно-генетические методы, позволяющие проводить видовую идентификацию особей на основе анализа выделенной из тканей и икры рыб мтДНК. В частности, этот подход был применен при создании международной системы паспортизации животных, присваивающей каждому индивидуальный (бар-кодинг) штрих-код на основании полиморфизма последовательности генов цитохром-оксидазы субъединицы 1 (COI) и цитохрома с-оксидазы мтДНК (Blaxter, 2003; Hebert et al., 2003). Методы видовой идентификации на основании нуклеотидной последовательности участков мтДНК были применены и к осетровым, однако в Северном Каспии в популяции русского ocerpa (Acipenser gueldenstaedtii) было обнаружено, что около трети особей имеют митохондриальный гаплотип, определяемый как гаплотип сибирского осетра (Acipenser baerii). Особи с данным гаплотипом морфологически являются типичными представителями вида русский осетр (Jenneckens et al., 2000; Birstein et al., 2000; Birstein et al, 2005) (далее в работе данный митохондриальный гаплотип обозначается как BL-гаплотип, типично русский как GUE-гаплотип, настоящий сибирский как ВАЕ-гаплотип).

Изучение маркеров мтДНК позволило разработать тест по выявлению BL-митотипа и его дифференциации от BAE-гаплотипа (Мюге и др., 2008). Анализ полных нуклеотидных последовательностей мтДНК (Rastorguev et al., 2008) позволил сделать некоторые выводы о филогении осетровых, однако с его помощью эффективно разделить персидских и русских осетров оказалось

невозможно. Для дальнейшего изучения данного вопроса требовалось изучение более информативных ядерных маркеров ДНК.

Микросателлитный (STR) анализ показал высокую эффективность для паспортизации производителей, однако дифференцировать русских, персидских, сибирских осетров и продукцию из них возможно лишь в случае присутствия в генотипе специфичных аллелей (Барминцева, Мюге, 2013). С применением STR-анализа в работе Тимошкиной Н.Н. (2009) были выдвинуты предположения о генетически отличающихся генофондах русского осетра азово-черноморского и каспийского ареала.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы — уточнение популяционной структуры русского осетра и его филогенетических связей с близкими осетровыми видами, а также оценка полиморфизма маточных стад русского осетра волжских ОРЗ и вклада искусственного воспроизводства в поддержание численности его волжско-каспийской популяции.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1. Оценить природный генетический полиморфизм русского осетра и производителей в современных маточных стадах волжских ОРЗ, участвующих в воспроизводстве молоди для поддержания природной численности волжско-каспийской популяции русского осетра.
- 2. С помощью анализа митохондриальных и ядерных маркеров ДНК оценить генетическую дифференциацию между русским, персидским и сибирским осетрами.
- 3. Провести филогенетическую реконструкцию формирования комплекса популяций русского, а также персидского осетров.

- 4. Сравнить морфометрические показатели персидских и русских осетров из Каспийского моря и оценить уровень морфологической дифференциации выборок между собой.
- 5. Оценить генетическую дифференциацию между выборками русского осетра из Азовского, Черного и Каспийского морей.
- 6. Оценить вклад искусственного воспроизводства в численность волжско-каспийской популяции русского осетра.

Научная новизна полученных результатов

Для оценки генетического полиморфизма маточных стад волжских осетровых рыбоводных заводов и оценке их вклада в поддержание численности волжско-каспийской популяции русского осетра впервые был применен масштабный подход генетического мониторинга взрослых производителей ОРЗ и молоди, собранной в речной и морской экспедициях.

В рамках данной рабты было проведено комплексное исследование различных выборок русского, персидского и сибирского осетров с использованием генетических маркеров как митохондриальной, так и ядерной ДНК (AFLP и SNP анализ). Впервые данными генетическими методами были оценены генетические расстояния между выборками русского и персидского осетров совместно с проведением морфометрического исследования.

Были найдены и апробированы новые маркеры ядерной ДНК для дальнейшей видовой идентификации осетровых и продукции из них.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные позволяют уточнить популяционную структуру и филогенетические связи русского осетра с персидским и с сибирским осетром. Найденные новые информативные генетические маркеры могут быть

использованы при разработке панели для идентификации видовой и популяционной принадлежности особей осетровых рыб и продукции из них для решения задач в рамках международной конвенции СИТЕС.

Полученные результаты позволяют оценить эффективность рыбохозяйственной деятельности волжских осетровых заводов по искусственному воспроизводству русского осетра.

Методы исследования

В работе использовали современные молекулярно-генетические методы по анализу ядерных и митохондриальных маркеров ДНК – SNP-анализ, микросателлитный анализ, метод AFLP, секвенирование контрольного региона мтДНК, видоспецифичная ПЦР для определения осетровых митотипов, а также морфометрическое исследование русских и персидских осетров. Генотипировали собранные ранее образцы из коллекции эталонных генетических материалов ФГБНУ «ВНИРО», а также собирали новые материалы на осетровых заводах во время бонитировок, во время получения икры и в экспедициях по реке Волге и в Каспийском море.

Положение, выносимое на защиту

Несмотря на наблюдаемое снижение численности природных популяций, генофонд русского осетра обладает высоким генетическим полиморфизмом, что позволяет оценивать популяционную структуру и филогенетические связи данного вида.

Личное участие автора

В работе для анализа использовали как ранее собранные образцы тканей осетровых рыб, внесенные в Российскую Национальную Коллекцию Эталонных Генетических Материалов ВНИРО (РНКЭГМ), так и образцы, собранные автором в экспедициях и во время бонитировок на рыбоводных осетровых заводах. Планирование, пробоподготовка, молекулярно-генетический анализ популяционных выборок осетровых, статистическая обработка, систематизация и описание полученных результатов выполнялись автором лично. Результаты генотипирования молоди, выполненные автором, сопоставляли с имеющейся в лаборатории базой данных осетровых производителей, в создании которой автор также принимал участие.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа выполнена с применением самых современных методов исследований. Обширный объем проанализированного материала, корректная статистическая обработка и тщательный дальнейший анализ результатов обеспечивают обоснованность и достоверность выдвинутых научных положений и сделанных выводов.

Материалы диссертации и её основные положения были представлены для обсуждения на международных конференциях в виде тезисов, постерных и устных докладов: международный конгресс студентов и молодых ученых «Перспектива-2007» (г. Нальчик, 2007 г.), XVI международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009» (г. Москва, 13-18 апреля 2009 г.), XIV европейский ихтиологический конгресс (г. Льеж, Бельгия, 3-8 июля 2012 г.) международная конференция «Evolution-2014» (г. Роли, Северная Каролина, США, 20-24 июня 2014 г.), XVI европейский ихтиологический конгресс (г. Лозанна, Швейцария, 2-6 сентября 2019 г.)

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, соответствующих требованиям ВАК и индексируемых в международных системах цитирования (SCOPUS, Web of Science) и 5 тезисов конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 120 страницах, содержит 25 рисунков, 18 таблиц и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, приложения. Библиография включает 178 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Положение Осетрообразных в пределах системы рыб

Осетровые — уникальная древняя реликтовая группа в системе рыб и рыбообразных со своими специфическими чертами, они являются одними из самых древних рыб, все еще живущих на Земле, начиная с верхнемелового периода (Bemis et al., 1997). Осетровые считаются «живыми ископаемыми», потому что не претерпели значительных морфологических изменений с момента возникновения группы (Grande, Bemis, 1991; Bemis et al.,1997).

Положение Acipenseriformes в таксономической системе рыб и сама таксономическая система менялись со временем по мере появления новых данных о филогении рыб и рыбообразных. В середине прошлого века Берг выделял в пределах класса Teleostomi два подкласса - Actinopterygii и Crossopterygii (представитель Latimeria). Actinopterygii подразделялись им на три группы: Chondrostei (представители осетровые), Holostei (представитель Amia) и Teleostei (собственно костистые). Берг также указывал на то, что осетровые произошли от примитивных Palaeonisciformes (вымерший надотряд Actinopterygii) путем утраты ряда окостенений в хрящевом черепе еще в юрский период (около 200 миллинов лет назад). Таким образом, среди ныне живущих Gnatostomata (челюстноротых позвоночных) осетровые являются одними из самых древних представителей (Берг, 1948, а, б). Данная система активно использовалась и нашла своё применение, например, в «Определителе пресноводных рыб фауны СССР» (Веселов, 1977).

По общепринятой в настоящее время таксономической системе (Расс, Линдберг, 1971) отряд Acipenseriformes (осетровые) относят к типу Vertebrata (позвоночные), подтипу Craniata (черепные), надклассу Gnathostomata (челюстноротые), классу Osteichthyes (костных рыб), подклассу Ganoidomorpha (ганоидные). Среди ганоидных выделяют четыре отряда: Acipenseriformes,

Polypteriformes, Amiiformes, Lepisosteiformes. Два отряда Acipenseriformes и Polypteriformes существенно отличаются от остальных ганоидов архаичными признаками, сближающими их с хрящевыми рыбами, поэтому их иногда выделяют в особый надотряд хрящевых ганоидов – Chondrostei или Palaeopterygii.

По системе, также используемой современными западными исследователями, отряд Acipenseriformes относится к типу Chordata, подтипу Craniata, надклассу Gnathostomata, класс Actinopterygii, подкласс Chondrostei (Нельсон, 2009).

1.2. Систематика и эволюционные отношения видов внутри отряда Acipenseriformes

Благодаря радиации внутри группы осетровых рыб к настоящему моменту в отряде насчитывается 25 видов. Все они распространены исключительно в северном полушарии, при этом понто-каспийский регион в настоящее время имеет наибольшее видовое разнообразие осетровых (Bemis et al., 1997). Большинство осетровых обитает в море и лишь часть в пресной воде, однако биология размножения осетровых такова, что все они нерестятся только в пресной воде, совершая при необходимости анадромные миграции (Bemis, Kynard, 1997).

Согласно общепринятой в настоящее время систематике семейство Асірепserіdae включает в себя 4 рода: Pseudoscaphirynchus (3 вида), Scaphirynchus (3 вида), род Huso (2 вида) и род Асірепser (17 видов) (Ветів, Купата, 1997). Эволюционные отношения в отряде Асірепserіformes все еще обсуждаются (Ктіедег et al., 2008). Например, современные молекулярно-генетические данные свидетельствуют о том, что род Huso не является монофилетическим, так как 2 вида Huso (белуга и калуга) располагаются в отдельных кладах относительно друг друга (Віrstein and DeSalle, 1998; Ludwig et al., 2001; Krieger et al., 2008), поэтому было предложено рассматривать данные виды в составе рода Асірепser (Vasil'eva et al., 2009).

1.3. Генетические особенности осетровых рыб

Осетровым свойственна не только морфологическая пластичность, но и широко распространенная гибридизация в том числе между отдаленными видами (Николюкин, 1957, 1965, 1972). По мнению некоторых исследователей именно она позволила различным группам осетровых видов приобрести различные уровни плоидности. Именно полиплоидное происхождение является одним из механизмов, обеспечивающих филогенетическое разнообразие рыб (Schultz, 1979). Исследователи (Birstein, Vasiliev, 1987) приводили в качестве доказательства полиплоидного происхождения осетровых большое количество ДНК в ядре клетки, а также возможность разделить кариотип осетровых на четыре хромосомные группы.

Последующие многочисленные исследования кариотипа и функциональной плоидности осетровых также подтвердили эту гипотезу. Предполагается, что полиплоидизация по аллоплоидному механизму происходила у осетровых как минимум три раза с сопутствующей межвидовой гибридизацией (Vasil'ev, 2009; Vasil'ev et al., 2010). Помимо аллоплоидной полиплоидии ряд авторов указывают, что полногеномная дупликация, то есть автоплоидия, может происходить неоднократно и независимо в различных таксонах рыб (Le Comber et al., 2004; Mable et al., 2011).

Другой особенностью генома осетровых является медленная по сравнению с другими рыбами молекулярная эволюция. Возможно, именно благодаря ей данная группа сохранила древнейшие черты, свойственные хрящевым ганоидам. При анализе ядерных генов было обнаружено, что у осетровых скорость накопления мутаций в ядерном геноме ниже по сравнению с костистыми рыбами (de la Herran et al., 2001; Krieger, Fuerst, 2002).

1.4. Группы осетровых видов рыб по уровню плоидности

В настоящее время среди осетровых выделяется три группы видов кариологически отличающихся по уровню плоидности (Васильев, 1985; Бирштейн, 1987; Ludwig et al., 2001; Вишнякова и др., 2008; Vasil'ev, 2009). К первой группе относятся виды с кариотипом примерно 120 хромосом (точное число колеблется от 112 до146). К данной группе относятся белуга *Huso huso*, стерлядь *Acipenser ruthenus*, шип *A. nudiventris*, севрюга *A. stellatus*, веслонос *Polyodon spathula*. Ко второй группе относятся 240-хромосомные виды с примерным количеством хромосом 240-270 — это, например, русский осётр *A. gueldenstaedtii*, сибирский *A. baerii*, адриатический осетр *А. naccarii*. К третьей группе относится *А. brevirostrum* с количеством хромосом 360-370 (Fontana et al., 2008; Vasil'ev, 2009). Данный вид имеет не только наибольшее число хромосом, но и соответственно самое большое количество ДНК среди всех представителей Асipenseriformes (Fontana et al., 2008).

Исследования полиморфизма альбуминов сыворотки крови, проведенные на различных осетровых, также показали различные уровни плоидности среди данных видов и позволили разбить их на 2 группы, совпадающие с группами мало- и многохромосомных видов (Кирпичников, 1987; Кузьмин, 1996).

Большая часть хромосом Acipenseriformes относится к микрохромосомам. Количество ДНК на клетку у осетровых в среднем в 2-4 раза больше по сравнению с позвоночными (Birstein et al., 1993).

На основании анализа окрашенных участков NORs для четырех видов осетровых было показано, что 120-хромосомные кариотипы имеют тетраплоидное происхождение, а 250-хромосомные октаплоидное (Бирштейн, Васильев, 1987). Анализ аллозимов крови осетровых также подтвердил дублирование белковых локусов у малохромосомных видов, что подтверждает их тетраплоидное происхождение (Birstein et al, 1997).

На основании цитологических исследований было высказано предположение об автополиплоидном происхождении 120-хромосомных видов от

общего предка хрящекостных рыб (Chondrostei) около 300 млн. лет назад. Последующие дупликации кариотипа с происхождением 240- и более высоко хромосомных осетровых видов происходили предположительно приблизительно 80 млн. лет назад, то есть не позднее верхнего мела (Birstein et al., 1997). Хотя предкового диплоидного вида с 60 хромосомами уже не существует (Dingerkus and Howell, 1976), предполагается автополиплоидия общего 60-хромосомного предка и последующая вторичная дупликация генома у различных дивергентно разошедшихся осетровых видов. Это могло произойти около 150-200 млн. лет назад (Birstein et al., 1997; Fontana et al., 2007). Исследователи (Ludwig et al., 2001) предположили, что произошло четыре события автополиплоидизации в эволюции осетровых видов рыб. Васильев и соавторы предположили полиплоидизацию аллоплоидного типа, которая могла произойти минимум три раза совместно с межвидовой гибридизацией (Vasil'ev, 2009; Vasil'ev et al., 2010).

В то же самое время функциональное поведение данных кариотипов демонстрирует меньшую плоидность. На основании анализа также участков NOR другая группа исследователей пришла к выводу, что функционально группа со 120 хромосомами является в полной мере диплоидной (Fontana, 1994), группа с 240 хромосомами тетраплоидная, а *A. brevirostrum* в свою очередь является гексаплоидом (Tagliavini et al., 1999; Fontana, 2002; Fontana et al., 2008).

Проведенные исследования микросателлитных локусов также показали, что осетровые виды со 120 хромосомами функционально диплоидные, а виды с 240 хромосомами тетраплоидные (Ludwig et al., 2001, Jenneckens et al., 2001, Fopp-Bayat, 2008). Помимо дисомного наследования для видов со 120 хромосомами и тетрасомного для видов с 240 хромосомами были обнаружены локусы, показавшие тетрасомное наследование для малохромосомных осетров и октасомное для многохромосомных (Havelka et al., 2013). Также существует работа с указаниями на полную диплоидизацию многохромосомного белого осетра (*A. transmontanus*) (Van Eenennaam et al., 1998). Однако другие авторы все же утверждают, что белый осетр имеет плоидность более 4n (Rodzen and May, 2003), и, возможно, более 8n (Schreier et al., 2011).

Согласно сравнению процессов функционального сокращения генома, 120 - хромосомные виды являются более древними по сравнению с более молодыми 240- и 360-хромосомными осетровым видами, где данный процесс до сих пор активен (Ludwig et al., 2001). Таким образом, при классификации плоидности осетровых используют две шкалы — фактическую и более общеупотребимую в настоящее время функциональную (Vasil'ev et al., 2009).

Отдельного упоминания заслуживает сахалинский осетр *Acipenser mikadoi*. Кариотип сахалинского осетра был изучен сравнительно поздно по сравнению с кариотипами других осетровых видов. В исследовании 1993 года (Birstein et al., 1993) содержание ДНК на клетку у этого вида оказалось самым высоким среди Acipenseriformes, и расчетное значение почти в два раза превышало значение для таких 240-хромосоных видов, как русский и сибирский осетр. В связи с этим для вида предположили примерное количество хромосом в кариотипе как равное примерно 480-500. Это цифра в последующем упоминалась и в других работах (Ludwig et al., 2001). Дальнейшие исследования показали, что сахалинский осетр, как и калуга, относится к группе 240-хромосомных осетров (Вишнякова и др., 2008; Васильев и др., 2009).

1.5. Исследования популяционной и нерестовой структуры русского осетра

Основные концепции формирования нерестовых групп осетровых и осуществления нерестовых миграций были разработаны Л.С. Бергом (1934). Сложная субвидовая структура позволила осетровым максимально освоить нерестилища в различные сезоны года. В соответствии с концепцией яровых и озимых нерестовых рас осетровых рыб, разработанной Бергом, яровые русские осетры мигрируют в реки в весенне-летний период со зрелыми половыми продуктами и их размножение происходит в тот же сезон. Озимые осетры мигрируют с незрелыми половыми продуктами в течение нескольких месяцев, зимуют и нерестятся следующей весной. Позднее данные положения были

полностью подтверждены гистофизиологическими исследованиями нерестящихся производителей осетровых (Баранникова, 1967).

Одним из первых крупных исследователей, внесших значительный вклад в изучение осетровых Каспия, был А.Н. Державин (1947, 1949), который охарактеризовал основные черты биологии осетровых рыб, исследовал нерестовые миграции, колебания численности и осуществлял прогнозирование уловов. Другим крупным исследователем биологии каспийских осетровых был Гербильский Н.Л., который предложил идентификацию представителей различных биологических групп осетровых не только по срокам нереста, но и по степени зрелости половых продуктов. Ученый связывал существование сезонных рас с эволюционным прогрессом вида и увеличением численности за счет использования одних и тех же нерестилищ в разное время года, что в свою очередь позволяет снизить конкуренцию за нерестовый субстрат (Гербильский, 1953). Исследователь одним из первых описал связь групп с гидрогеографией рек, а также изучал влияние гидростроительства на биологию осетровых (1953; 1957 а, б).

Стратегия озимых осетров позволяет весной подниматься выше по течению и использовать недоступные яровым осетрам места нереста. Гербильский (1957 а, б) указывал, что в свете данных о биологии осетров, причина существования озимой стратегии кроется не в необходимости низких температур для созревания половых продуктов, как предполагал Берг (1934), и не из-за нерестовых миграций с отдаленных нагульных пастбищ, как предполагал Державин (1947), а является эволюционным приспособлением, позволяющим озимым мигрантам копить энергетические запасы для зимовки и затем эффективно осваивать отдаленные нерестилища весной. Таким образом, различия в сезонных пиках нерестовой активности в различных реках бассейна Каспия автор связывает с гидрографией этих рек — температурным режимом, паводками, колебаниями мутности, наличием зимовальных ям и т.д. В своей работе он пишет, что годичный цикл нерестовых пиков является эволюционным приспособлением осетровых для наиболее полного освоения нерестилищ в определенных гидрологических

условиях и, возможно, является предпосылкой механизмов будущего видообразования.

Для нереста русского осетра в Куре, Гербильский выделял три яровых пика – ранний, поздний и осенний, связанные с тремя сезонными паводками в реке. Причем, ранний и осенний яровой нерестились при температурах 12-15 градусов на одних и тех же нерестилищах, а поздний яровой при температуре 18-23 градуса нерестился выше по реке, для чего входил в реку во время второго паводка в мае и нерестился только осенью. Озимый осетр с незрелыми половыми продуктами входил в Куру в августе месяце (Гербильский, 1957 а, б). По этим данным поздний яровой осетр подходит под описание условий нереста персидского осетра. Автор указывал на объективные различия биологических групп и предлагал меры, уменьшающие вред гидростроительства, с учетом существования сложной субвидовой структуры осетровых (Гербильский, 1953).

Самые многочисленные исследования были посвящены нересту русского осетра в реке Волге (Алявдина, 1951, 1956; Гербильский, 1957б). Согласно данным работам, в Волге в течение апреля в нижние участки реки входил и сразу же нерестился ранний яровой осетр с текучими половыми продуктами. Вслед за ним отмечался ход позднего ярового осетра с незрелыми половыми продуктами, который позже нерестился выше по течению. Осенью в реку входили два типа озимых осетров — со зрелыми и незрелыми половыми продуктами. Более зрелые озимые осетры после зимовки нерестились сразу же на нижних участках реки, а озимые с большим количеством жира и незрелыми половыми продуктами использовали после зимовки нерестилища, расположенные выше по течению. Отдельной группой была названа жилая немигрирующая туводная форма русского осетра.

После строительства волжской ГЭС изучение и дальнейший мониторинг внутривидовых групп осетровых Волги продолжились. Несмотря на то, что было отсечено более 70 процентов нерестовых площадей, особи русского осетра продолжали нереститься как в дикой природе, так и с помощью работы

рыбоводных осетровых заводов (ОРЗ) (Танасийчук, 1963; Хорошко, Власенко 1972; Власенко 1982 а, б).

При исследовании внутривидовых групп русского осетра были изучены особенности не только озимой, яровой групп, но также был описан позднеяровой (персидский) осетр реки Волги (Казанский 1962; Лукьяненко 1973, 1984, 1986; Лукьяненко и др., 1973, 1974, Путилина, 1983 а, б).

В этот период оценивались не только биологические характеристики, но и численность осетра в период нерестового хода (Французов, 1960; Павлов, 1981; Вовк, 1966; Легеза, 1970, 1973; Пашкин, 1967, 1969; Шилов, 1968, 1970), условия миграции и зимовка (Путилина, Распопов, 1984; Распопов, Путилина 1989), а также условия формирования нерестовых популяций и запасов русского осетра (Ходоревская, 1992, 1996; Пальгуй, 1992; Ходоревская и др., 1997, Власенко и др., 2003).

В последующих исследованиях оценивалась как динамика запасов в Волго-Каспийском рыбохозяйственном бассейне (Ходоревская и др., 2000; Власенко и др., 2003), так и влияние на нее естественных факторов и деятельности человека (Власенко, 2001; Власенко и др., 2001).

Для русского осетра реки Урал указывалось, что сроки миграций сходны с таковыми на Волге (Державин, 1947). Для Урала описывалось существование ярового и озимого осетров, отмечался растянутый нерест немногочисленных осетров после выраженного типично ярового пика (Быков, 1956; Гербильский, 1957 а; Шапошникова, 1964).

Исследователи Бабушкин и Борзенко (1951) приводили следующие важные осетровые нерестовые реки Каспия - Волга, Урал, Кура, Сефидруд и более мелкие Терек, Сулак, Самур, Ленкоранка, а также реки иранского побережья — Тенджен, Бабуль, Миреруд, Лаларуд, Чамхала, Рудессер, Паларуд, Сардабруд, Хейруд и Буган. Важнейшей рекой на севере признавалась Волга, а на юге Кура и Сефидруд, куда осетровые мигрировали в неизмеримо больших количествах, чем в другие реки Среднего и Южного Каспия. Авторы выделяли три основных популяции русского осетра - Acipenser gueldenstaedti Brandt волжский или

северокаспийский осетр, нерестящийся в Волге и Урале, Acipenser gueldenstaedti persicus Borodin иранский сефидрудский осетр, нерестящийся также в реках Ирана и Acipenser gueldenstaedti persicus natio kurensis Beljaeff - осетр реки Кура.

Относительно распределения осетровых в Каспии, исследователями было выяснено (Пискунов, 1965, 1970), что сезонные перемещения осетровых рыб главным образом обусловлены кормовыми условиями и отчасти температурой воды водоема. Распределение и качественный состав осетровых стад на пастбищах Среднего, Южного и отчасти Северного Каспия было подробно описано М.И. Легезой (1967, 1970, 1973). В Северном Каспии работы по учету распределения и численности русского осетра проводили Павлов А.В. и Захаров С.С. (1971), Коробочкина (1970).

Полное географическое разделение черноморской и каспийской популяции русского осетра, очевидно, происходило 15-40 тыс. лет назад и было связано с разделением котловин Черного и Каспийского морей (Свиточ и др., 1999). Для Азово-Черноморского осетра в реке Дон отмечалось наличие всего двух рас – ранней яровой и озимой, для реки Кубань только одной – раннего ярового осетра (Гербильский, 1957 б). Для осетра реки Днепр было показано, что озимая раса практически отсутствует (Берг, 1948). Отмечались морфологические отличия азово-черноморских осетров от каспийских и более поздние сроки созревания производителей (Марти, 1940; Берг, 1948; Артюхин, Заркуа, 1986; Митрофанов и 1986; Подушка, 1988; Лукьяненко 1990). В др., И др., качестве дифференцирующего экологического признака отмечалось, что предличинки русского осетра Азово-Черноморского рыбохозяйственного бассейна проявляют отрицательную реакцию на свет, а каспийские - слабо положительную (Бабурина, 1957; Беляева и др., 1972).

В настоящее время для русского осетра дикой азовской популяции доля искусственно воспроизведенных рыб достигает 95% (Реков, Корнеев, 1987; Реков, 2000).

1.6. История вопроса персидского осетра

По оценкам специалистов в 2006 и 2007 годах численность персидского осетра в Каспии составила порядка 10 миллионов экземпляров (Сафаралиев и др., 2008). Он претерпел меньшее снижение численности за последние десятилетия по сравнению с другими осетровыми (Джаваншир и др., 2006). Таксономический статус персидского осетра многократно обсуждался и до сих пор вызывает дискуссии.

Впервые персидский осетр был описан Н.А. Бородиным в 1897 году в публикации, посвященной зоологической экскурсии по Северному Каспию на крейсере «Уралец» (Бородин, 1897). Название «персидский», как исторически возникшее в народе для данной формы, было оставлено Бородиным, несмотря на то, что данную работу и первое описание он проводил, путешествуя по Северному Каспию вблизи устья реки Урал. Ученый описал морфологические признаки и указал летние сроки нереста для персидского осетра, из-за которых его называли также поздней яровой формой русского осетра.

Бородин (1897) отмечал более крупные размеры и вес персидских осетров по сравнению с типичными русскими осетрами, большую прогонистость тела персидского осетра, более узкие плавники, отличия в пропорциях головы. В более поздних работах другие авторы отмечали те же характерные особенности в пропорциях тела и головы персидского осетра (Беляев,1932; Магерамов, 1972; Лукьяненко, 1974; Путилина, 1983 а; Артюхин, 2008).

Усики у персидского осетра расположены ближе к концу рострума и, если рыло русского осетра более тупое, то у персидского оно более вытянутое и больше смотрит вниз. За характерную форму рыла персидского осетра хотели назвать «клюворылым», но было решено оставить историческое название. Также автор указывал на отличия в окраске русского и персидского осетров.

Относительно различий в окраске авторами для персидского осетра указывается серо-стальная, серо-голубая, темно синяя окраска тела со спины и белое брюхо; для русского — желтоватая, желтовато-серая или желтовато-

коричневая и желтоватое брюхо (Бородин, 1897; Гербильский и др.,1951; Лукьяненко и др., 1974; Артюхин, 2008). Для черноморского «колхидского» осетра также характерно белое брюхо и синеватая спина, но окраска более темная, порой почти черная (Артюхин, Заркуа, 1986).

При идентификации персидского осетра многие авторы указывают на особенности меристических признаков (Беляев, 1932; Берг, 1961; Лукьяненко и др., 1974; Путилина, 1983 а; Артюхин, 2008). Подробно изучив результаты экспедиции Беляева, Берг предложил описание различий между русским и персидским осетром. Для русского осетра — «Боковых щитков 30-50, в среднем 39,0; спинных щитков 9-18, в среднем 12,1; жаберных тычинок на первой дуге 19-29, в среднем 23,5; лучей в спинном плавнике 33-51, в среднем 41,0 — Северная часть Каспийского моря (между устьями Волги и Урала)». Для персидского осетра — «Боковых щитков 21-42, в среднем 30,6; спинных щитков 5-13, в среднем 10,2; жаберных тычинок 15-29, в среднем 21,0; лучей в спинном плавнике 30-49, в среднем 38,8 — Южная часть Каспийского моря» (Берг, 1961).

Сходные данные для меристических признаков персидского и русского осетра приводят и другие исследователи (Артюхин, Заркуа, 1986; Артюхин, 2008; Беляев, 1932; Лукьяненко и др., 1974; Магерамов, 1972; Марти, 1940; Митрофанов, 1986; Подушка, 1988; Подушка, 2003; Путилина, 1983 б). Однако, если одни авторы по расхождению в меристических признаках дают персидскому осетру видовой статус, то другие, например, Митрофанов В.П. с соавторами в книге «Рыбы Казахстана» (Митрофанов и др., 1986) указывает, что морфологические отличия персидского осетра незначительны и достаточны лишь для утверждения о подвидовом статусе, предложенном еще Бергом (1933, 1934, 1940, 1961).

По описанию Бородина, русский и персидский осетр имеют морфологические различия, однако среди общей массы встречаются особи с переходными признаками, как указывал автор, вероятные межвидовые гибриды русского и персидского осетров.

Межвидовая природная гибридизация осетровых — широко известное явление, которое упоминается в работах многих авторов (Николюкин, 1972; Глухов, 2000; Субботкин и Субботкина, 2001; Переварюха и др., 2008). Берг в своей книге «Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран» описывает межвидовые и даже межродовые осетровые гибриды (Берг, 1961). Другой вопрос - можно ли считать гибридизацией скрещивание близких форм, которые, возможно, представляют собой нерестовые группы в пределах одного вида.

Возможно, именно существование переходных морфологических форм вызывало критику валидности видового статуса персидского осетра. В недавно переизданной книге воспоминаний Бородина можно найти рассказ ученого о том, открытие персидского осетра поначалу не признавалось известным ихтиологом Бергом Л.С. (Бородин, 2009). В трудах самого Берга можно найти небольшую отдельную главу, посвященную персидскому осетру, где ученый описывает свою итоговую позицию по данному вопросу (Берг, 1961). По его словам, это связано с работой Каспийской рыбопромысловой экспедиции 1930 года, предоставившей обширный биометрический материал – было исследовано более двухсот особей персидского и русского осетров. После знакомства с материалами экспедиции, опубликованными исследователем Беляевым в 1932 году (Беляев, 1932), Берг называет персидского осетра «биометрически хорошо отграниченным», однако дает ему не видовой статус, а называет хорошо различимым подвидом русского осетра, называя его Acipenser gueldenstaedti persicus Borodin (Берг 1940, 1961). После экспедиции Беляева некоторые авторы стали называть именно куринского осетра Acipenser gueldenstaedti persicus natio Belyaeff (Державин, 1949).

Гербильский Н.Л также описывал позднеяровую форму русского осетра, не давая ей видовой статус (Гербильский и др.,1951). Система, разработанная Гербильским, расширялась и подкреплялась фактическими данными. Продолжатели исследований биологии осетровых идентифицировали позднюю яровую форму русского осетра, однако не рассматривали её в качестве отдельного

вида (Баранникова, 1957, 1975; Казанский, 1951, 1975; Чугунов и Чугунова, 1964; Песериди, 1966, 1971; Легеза, Войнова, 1967).

С началом активного применения иммунохимического анализа в биологии вопрос таксономического ранга персидского осетра был вновь поднят. Метод был применен для исследования субвидовой структуры русского осетра. Так, по данным исследователя Амирханова Г.А., существуют антигенно-серологические отличия между группой южно-каспийских стад и группой северо-каспийских стад, причем стада внутри групп, приуроченные к разным рекам также имеют свои особые характеристики. Автором были исследованы выборки из волжского, куринского, терского, сулакского и самурского осетровых стад. (Амирханов, 1964 а, б, в). Наличие серологической дифференциации между стадами различных рек было подтверждено позже и другими авторами (Лукьяненко и др. 1968; Субботкин и Субботкина, 1997). Эти данные послужили основанием выделения южнокаспийского осетра в отдельный вид персидский осетр. В последующих работах часть исследователей при описании биологии персидского осетра использовали именно этот таксономический статус (Лукьяненко и др., 1974; Артюхин, 1983; Артюхин, Андронов, 1981; Артюхин, Путилина 1985; Путилина, 1983 а, б).

Также некоторые немногочисленные исследователи утверждали, что персидский осетр обитает не только в каспийском, но и в Азово-Черноморском рыбохозяйственном бассейне. Осетр черноморского побережья Кавказа был описан Марти В.Ю. (Марти, 1940) и назван Acipenser gueldenstaedti colchicus. На основании морфологического анализа и изучения сроков нереста осетр кавказского побережья - реки Риони и Ингури был позднее назван другими исследователями Acipenser persicus colchicus (Артюхин, Заркуа, 1986; Артюхин, 2008). Таким образом, в настоящее время некоторыми авторами колхидский (рионский осетр) указывается как азово-черноморский подвид персидского осетра (Артюхин, Заркуа, 1986; Соколов, 2002; Артюхин, 2008), однако следует упомянуть, что данное исследование было сделано в 1986 г. на нескольких

экземплярах и других расширенных работ с теми же выводами в литературе не встречается.

Современные исследователи указывают, что морфологические, поведенческие и экологические признаки для персидского осетра не достигают видового уровня по отдельности (Подушка, 2003). Рядом авторов персидский осетр рассматривается в пределах вида русский осетр (Карпинский, 2002; Митрофанов и др., 1986; Birstein et al., 2005; Ruban et al., 2008).

В то время как одними авторами отмечаются морфологические различия между персидскими и русскими осетрами (Vasil'eva, 2004), существуют работы, где авторы описывают отсутствие достоверных морфологических различий между персидским и русским осетрами как по меристическим, так и по пластическим признакам, а также указывают на отсутствие генетической дифференциации между ними на основании анализа нуклеотидной последовательности контрольного региона и гена цитохром-b мтДНК (Ruban et al., 2008, 2011).

Вопрос корректности использования в полевых условиях меристических признаков для идентификации особей персидского осетра в своей работе рассматривал Сафаралиев И.А. (2008). Автор указывает на то, что существуют различия по средним значениям для русского и персидского осетров, однако размах изменчивости в крайних значениях перекрывается, поэтому использование меристических признаков для идентификации в полевых условиях эффективно лишь для части особей.

Берг называл персидского осетра южнокаспийским подвидом русского осетра, отмечая его более широкое распространение на юге Каспия по сравнению с севером. На основании данных Беляева Берг отмечает, что в реке Урал персидский осетр встречается реже, чем в южных реках Сефидруд и Кура, где его массовый нерест проходит в конце июля и в августе (Берг, 1961). Беляев в своей работе также называл персидского осетра южнокаспийским и просто куринским осетром (Беляев, 1932).

По результатам траловых уловов 2002 года в Северном Каспии 91% зимой и 88% летом составляет русский осетр, остальная часть - персидский. В Среднем Каспии весной персидский составляет 58%, остальное - русский осетр, однако летом ситуация меняется, и доля русского осетра увеличивается до 75%. В Южном Каспии доля траловых уловов персидского осетра увеличивается от зимы к лету с 65% до 89%. В целом по Каспийскому морю за 2002 год доля траловых уловов русского осетра в среднем составила 63-70% и для персидского осетра соответственно 30-37% (Переварюха и др., 2003). В настоящее время данное соотношение для нерестовых рек также меняется с севера на юг. Указывается, что в Волге, Урале и Тереке преобладает русский осетр, а в Сулаке, Куре и реках Ирана персидский (Артюхин, 2008).

Таким образом, в настоящее время персидский осетр описывается как анадромный, предпочитающий воды Южного Каспия, как более теплолюбивый и стеногалинный по сравнению с русским осетром Северного Каспия (Легеза, 1968). Его летний нерест обусловлен большей теплолюбивостью и проходит в период гидрологического лета при температуре воды в 18-23°С (Лукьяненко и др. 1974; Артюхин, 2008), в то время как типичный русский осетр нерестится при температуре 8-16°С, предпочитая нижние диапазоны температур (Алявдина, 1951, 1956; Пашкин, 1967). Ареалы русского и персидского осетров схематично представлены на Рисунке 1.

По исследованиям 2005-2007 годов русский и персидский осетры нагуливаются в Северном, Среднем и Южном Каспии. Отмечается возросшее количество нагуливающегося персидского осетра не только на Юге, но и на Севере, что свидетельствует о благоприятных трофических условиях данной акватории (Молодцова, 2008). Спектры питания персидского и русского осетра совпадают. Оба являются пластичными эврифагами, предпочитающими бентос (Карпинский, 2002). В процентном отношении на одних и тех же пастбищах предпочтения различаются. Русский осетр с возрастом переходит от червей и ракообразных на рыбу и моллюсков, а персидский потребляет рыбу и большое количество моллюсков на всех возрастных стадиях.

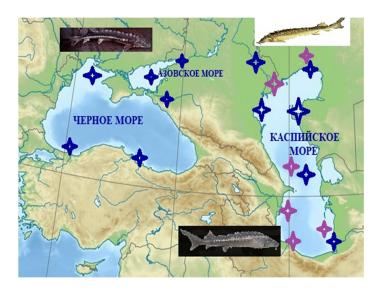


Рисунок 1.1 – Схематичное отображение ареала русского осетра (синий цвет) и персидского осетра (фиолетовый цвет)

Также были отмечены различия в коэффициентах накормленности – индекс наполнения желудка персидского осетра в среднем был в полтора раза выше (Молодцова, 2006, 2008). О различиях в питании говорит и другое исследование (Дубинин и Котляревская, 1989), в котором было показано различие в относительных размерах желудков персидского и русского осетра из Волги. На выборке более чем 500 штук самцов и самок русского и персидского осетра было показано, что относительные размеры желудка персидского осетра больше. Говоря о физиологических различиях, можно также отметить, что персидский осетр обладает более медленным темпом роста и меньшей плодовитостью (Бабушкин, Борзенко, 1951).

1.7. Молекулярно-генетические исследования понто-каспийских осетровых

В последние десятилетия для видовой идентификации, в том числе в коммерческом осетроводстве, широко используются данные, основанные на

сопоставлении нуклеотидной последовательности мтДНК. Небольшой генетический материал, содержащийся в ней, является достаточно консервативным и при этом достаточно информативным не только для генетической идентификации большинства видов, но и для изучения вопросов филогении, филогеографии и популяционной генетики.

Однако применение этого метода для разделения близких видов осетровых адриатического, персидского, русского и сибирского осетров малоэффективным, чтобы идентифицировать однозначно видовую принадлежность особи по анализу мтДНК (Birstein and DeSalle, 1998; Birstein et al., 2000; Birstein and Doukakis, 2001; Birstein et al., 2005). В работах сравнивались митохондриальные гены 12S, 16S, ND5, цитохрома-b и контрольный регион. В итоге для данных выборок было обнаружено не четыре (для каждого свой специфичный), а только два четко идентифицируемых митотипа – условно названные сибирским и русским. На основании анализа данных участков мтДНК адриатический и персидский осетр попадают в единую кладу с русским осетром. Исходя из этих данных и морфометрических сравнений, авторы поставили под сомнение валидность видового статуса персидского осетра (Birstein et al., 2005). Также авторы отметили морфологическую близость русского, персидского и адриатического осетров между собой и при этом их четкую генетическую и морфологическую дифференциацию от вида сибирский осетр, связанного с ними филогенетически и имеющего с ними общего понто-каспийского предка.

Предполагается, что сибирский осетр возник в результате миграции осетров между каспийским и арктическим бассейнами, что привело к вселению из Каспийского моря предков сибирского осетра в реки арктического бассейна. Согласно оценке с применением подхода молекулярных часов (Peng et al., 2007), это произошло приблизительно 24 млн. лет тому назад. Именно с этого времени началось формирование сибирского осетра как самостоятельного вида, отличающегося как по морфологическим признакам, так и по митохондриальной ДНК. Современный ареал сибирского осетра и его возможных подвидов схематично представлен на Рисунке 1.2.

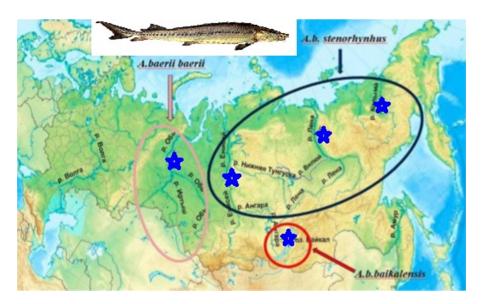


Рисунок 1.2 — Схематичное отображение ареала сибирского осетра, его основные выделяемые популяции (Объ-иртышская, Енисейская, Ленская, рек Индигирка и Колыма, оз. Байкал) и предлагаемое разделение на подвиды (Богуцкая, Насека, 2004)

Сибирский митотип (без первоначального разделения на митотипы «baerii» и «baerii-like») был изначально описан у ста процентов сибирских осетров и у трети каспийских русских осетров. Русский митотип был обнаружен у двух третей русских осетров Каспия и в ста процентах у адриатического и персидского осетров. Несмотря на различия в частотах митотипов в популяциях каспийского русского и персидского осетра, для уточнения дистанции между данными видами требовались новые генетические данные.

Исследования с применением полного секвенирования митохондриальной ДНК (Rastorguev et al., 2008) показали, что наиболее близкими являются митотип типично русского и адриатического осетров, близок к их кладе митотип персидского, а единую отдельную кладу по отношению к данным митотипам образуют типично сибирский митотип и близкий к нему baerii-like (подобный сибирскому) митотип, который встречается у трети русских осетров в Каспии.

Со временем удалось найти нуклеотидную замену в контрольном регионе мтДНК, позволяющую разделять типичный baerii (сибирский) и baerii-like (подобный сибирскому) митотипы (Мюге и др., 2008).

Авторы уже упоминавшегося исследования, посвященного сравнению морфологии и генетики персидского и русского осетров (Ruban et al., 2008, 2011), исследовавшие 28 морфометрических признаков, классически применяемых в морфометрии осетровых, приходят к выводу о необоснованности выделения персидского осетра в отдельный вид. По полученным в данной работе морфологическим данным персидский и русский осетр не имеют достоверных различий. Вторая часть данного исследования была посвящена генетике. Авторы сравнивали участки митохондриальной ДНК - контрольный регион и цитохром-b двух выборок. Результаты исследования подтвердили более ранние выводы исследований мтДНК - по секвенированию гена цитохрома-b и контрольного региона русский и персидский осетры не разделяются.

Таким образом, генетических данных, содержащихся в митохондриях, оказалось недостаточно для достоверной оценки генетической связи персидского и русского осетров, поэтому в дальнейшем необходимо было исследовать ядерные гены, несущие несоизмеримо большее количество генетической информации.

Изучение и сравнение полиморфизма ядерных генов возможно различными способами. Одним из них являются различные вариации метода фингерпринтинга. Дементьева Н.В. и её коллеги из ГНУУ ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных применяли метод с использованием рестриктаз с гибридизацией с меченым олигонуклеотидным зондом для сравнения выборок персидского и русского осетров (Дементьева и др., 2004). Авторы обнаружили небольшую дифференциацию выборок и указали на необходимость дальнейших исследований.

Использование микросателлитных локусов для выявления дифференциации между русскими и персидскими осетрами эффективно лишь при наличии у особей специфичных аллелей (Барминцева, Мюге, 2013). Иранскими исследователями по анализу полиморфизма четырех микросателлитных локусов были сделаны выводы о популяционной подразделенности персидского осетра рек бассейна Южного Каспия. Сравнения с выборками русского осетра для определения

генетических дистанций авторами не проводилось (Chakmehdouz et al., 2011). Таким образом, для изучения связей персидского и русского осетров целесообразны дальнейшие генетические исследования, в том числе с применением анализа ядерных маркеров ДНК.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Сбор материалов

Образцы для настоящей работы собирали в период с 2002 по 2016 гг. в экспедициях, а также во время бонитировок и при получении икры на осетровых рыбоводных заводах (ОРЗ). Фрагменты плавников от живых особей фиксировали в 96% этиловом спирте. Все взятые образцы занесены в базу данных и в настоящее время хранятся в Российской национальной коллекции эталонных генетических материалов (РНКЭГМ) ВНИРО (Свидетельство об официальной базы данных № 2006620351). Каждому образцу регистрации присвоен индивидуальный идентификационный номер. В рамках данной работы молекулярно-генетическими общей различными методами В сложности исследовали 1163 особи.

Сборы образцов для генетического мониторинга молоди осетровых проводили в период ската сеголеток в реке и с августа по сентябрь в период нагула молоди в море. Наблюдения за покатной миграцией молоди осетровых проводили на НИС «Дафния» в р. Волга (Рисунок 2.1) и её водотоках на трёх участках, расположенных ниже района выпуска. Первый участок находился на р. Ямная у с. Житное, где проходит покатная миграция молоди, выпущенной с Александровского и Житнинского ОРЗ. Второй участок был расположен в районе «4-й Огневки», третий — «8-й Огневки» Волго-Каспийского морского судоходного канала (ВКМСК), по которому скатывается большая часть заводской молоди с 5 осетровых рыбоводных заводов ФГБУ «Севкаспрыбвод» (ЛОРЗ, БОРЗ, СОРЗ, АОРЗ и ЖОРЗ) и научно-экспериментальной базы ФГБНУ «КаспНИРХ» «БИОС».

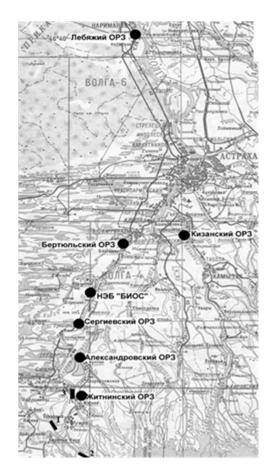


Рисунок 2.1 – Карта проведения контрольных выловов молоди в рейсах на реке Волга (ОРЗ отмечены кругами, участки траления отмечены прямоугольниками: 1-4-я Огневка, 2-8-го Марта, 3-Рот Фронт)

Тралово-акустические съемки по изучению молоди осетровых видов рыб на акватории западной части Северного Каспия проводили с 27 августа по 15 сентября 2016 г. на научно-исследовательском судне НИС «Гидробиолог». В исследованиях на акватории мелководной части Северного Каспия использовали стандартный 9-метровый донный трал, с вставкой из килечной дели с ячеей 6 мм и длиной 4,5 м. Научно-исследовательские работы проводили на глубинах от 2,8 до 8,0 м по стандартной многолетней схеме станций для съемок молоди осетровых. Для дальнейшего изучения были взяты фрагменты плавников от 197 особей сеголеток русского осетра. Карта траловых локаций представлена на Рисунке 2.2.

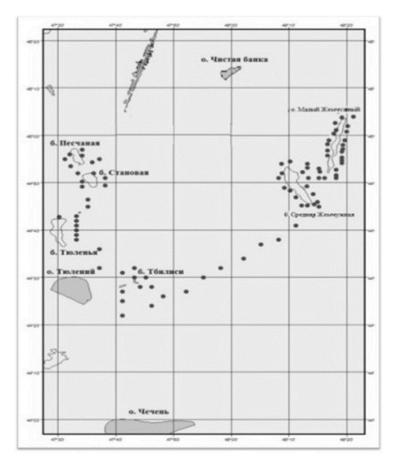


Рисунок 2.2 – Карта траловых станций морского рейса 2016 г.

За десять дней рейса во всех исследованных локациях взяли образцы тканей на генетические исследования суммарно от 266 сеголеток осетровых. Общее количество выловленных и измеренных особей составило 1047 экз., из них 1043 особей русского осетра.

Дальнейшую идентификацию выловленной молоди осетровых рыб в проводили на основании генетической идентификации и сопоставления с данными осетровых производителей, использовавшихся в нерестовых компаниях на волжских ОРЗ и занесенных в электронную базу данных.

2.2. Морфометрическое исследование персидских и русских осетров

У каждой особи из смешанной выборки осетров типично русского (82 шт.) и персидского (72 шт.) морфотипов, выловленных в Северном Каспии в 2008 г., проанализировали основные морфометрические признаки (пластические и меристические), применяемые в работах по морфометрии осетровых (Магерамов, 1972; Крылова и Соколов, 1981; Артюхин, 2008), также был зафиксирован тип окраски, сделаны фотографии - вид сверху и сбоку, а также сделано фото головы. Дополнительно в протокол описаний заносили данные по предварительной экспресс-оценке принадлежности особи (персидский или русский морфотип). В протоколе обязательно отмечали, если особь обладала признаками обоих морфотипов. Для морфометрии дополнительно были добавлены экспериментальные неклассические параметры Sp, Sd, Sao (Таблица 2.1) Если какие-либо признаки не были измерены у всех особей, то в итоговых данных это было отражено в значении п (размер выборки).

В дальнейшем по полученным морфометрическим данным была проведена оценка достоверности различий индексов между выборками с персидским и русским морфотипами. Меристические признаки анализировали с помощью теста Man-Whitney и критерия Стьюдента, индексы пластических признаков с помощью дисперсионного анализа ANOVA, а для совокупности особей и всех признаков был проведен PCA анализ (в пространстве главных компонент). Для расчетов использовали пакет программ Statistica v.6.0.

Также от каждой особи брали и фиксировали фрагменты плавников для дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

Таблица 2.1 – Список исследованных морфометрических параметров

ВО Число спинных жучек SL1 число боковых жучек в левом ряду SL2 число боковых жучек в правом ряду SV1 число брюшных жучек в правом ряду SV2 число брюшных жучек в правом ряду L, см абсолютная длина тела l, см промысловая длина тела С, см длина головы R, см длина рыла до глаза Sao (SXp), см ширина рострума на уровне anter orbitale Sno, см расстояние между обонятельными капсулами антердорсальное расстояние от конца рыла до аD (LD), см переднего края D Hco, см высота головы у глаза Hc, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта Rci, см расстояние от конца рыла до усиков			
SL1 число боковых жучек в левом ряду SL2 число боковых жучек в правом ряду SV1 число брюшных жучек в левом ряду SV2 число брюшных жучек в правом ряду L, см абсолютная длина тела l, см промысловая длина тела C, см длина головы R, см длина рыла до глаза Sao (SXp), см ширина рострума на уровне anter orbitale Sno, см расстояние между обонятельными капсулами антердорсальное расстояние от конца рыла до aD (LD), см переднего края D Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	Морфометрические признаки		
SL2 число боковых жучек в правом ряду SV1 число брюшных жучек в левом ряду SV2 число брюшных жучек в правом ряду L, см абсолютная длина тела l, см промысловая длина тела C, см длина головы R, см длина рыла до глаза Sao (SXp), см ширина рострума на уровне anter orbitale Sno, см расстояние между обонятельными капсулами антердорсальное расстояние от конца рыла до переднего края D Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	SD	число спинных жучек	
SV1 число брюшных жучек в левом ряду SV2 число брюшных жучек в правом ряду L, см абсолютная длина тела l, см промысловая длина тела C, см длина головы R, см длина рыла до глаза Sao (SXp), см ширина рострума на уровне anter orbitale Sno, см расстояние между обонятельными капсулами антердорсальное расстояние от конца рыла до aD (LD), см переднего края D Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	SL1	число боковых жучек в левом ряду	
SV2 число брюшных жучек в правом ряду L, см абсолютная длина тела 1, см промысловая длина тела С, см длина головы R, см длина рыла до глаза Sao (SXp), см ширина рострума на уровне anter orbitale Sno, см расстояние между обонятельными капсулами антердорсальное расстояние от конца рыла до аD (LD), см переднего края D Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	SL2	число боковых жучек в правом ряду	
L, см абсолютная длина тела 1, см промысловая длина тела С, см длина головы R, см длина рыла до глаза Sao (SXp), см ширина рострума на уровне anter orbitale Sno, см расстояние между обонятельными капсулами антердорсальное расстояние от конца рыла до аD (LD), см переднего края D Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	SV1	число брюшных жучек в левом ряду	
1, см промысловая длина тела C, см длина головы R, см длина рыла до глаза Sao (SXp), см ширина рострума на уровне anter orbitale Sno, см расстояние между обонятельными капсулами антердорсальное расстояние от конца рыла до переднего края D Hco, см высота головы у глаза Hc, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	SV2	число брюшных жучек в правом ряду	
С, см длина головы R, см длина рыла до глаза Sao (SXp), см ширина рострума на уровне anter orbitale Sno, см расстояние между обонятельными капсулами антердорсальное расстояние от конца рыла до аD (LD), см переднего края D Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	L, см	абсолютная длина тела	
R, см длина рыла до глаза Sao (SXp), см ширина рострума на уровне anter orbitale Sno, см расстояние между обонятельными капсулами антердорсальное расстояние от конца рыла до аD (LD), см переднего края D Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	1, см	промысловая длина тела	
Sao (SXp), см ширина рострума на уровне anter orbitale Sno, см расстояние между обонятельными капсулами aH сручной артиги ар	С, см	длина головы	
Sno, см расстояние между обонятельными капсулами аD (LD), см переднего края D Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	R, см	длина рыла до глаза	
антердорсальное расстояние от конца рыла до аD (LD), см переднего края D Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	Sao (SXp), см	ширина рострума на уровне anter orbitale	
аD (LD), см переднего края D Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	Sno, cm	расстояние между обонятельными капсулами	
Нсо, см высота головы у глаза Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта		антердорсальное расстояние от конца рыла до	
Нс, см высота головы у затылка Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	aD (LD), см	переднего края D	
Srci, см ширина рыла у усиков SRr, см ширина рыла у рта	Нсо, см	высота головы у глаза	
SRr, см ширина рыла у рта	Нс, см	высота головы у затылка	
	Srci, см	ширина рыла у усиков	
Rci, см расстояние от конца рыла до усиков	SRr, cm	ширина рыла у рта	
	Rci, см	расстояние от конца рыла до усиков	
Rr, см расстояние от усиков до рта	Rr, см	расстояние от усиков до рта	
Sp, см ширина тела у основания брюшных плавников	Sp, см	ширина тела у основания брюшных плавников	
ширина тела у переднего края спинного		ширина тела у переднего края спинного	
Sd, см плавника	Sd, cm	плавника	

2.3. Выделение ДНК

Выделение и очистку ДНК из фрагментов плавников осетровых рыб проводили на адсорбционных колонках PALL 5051 (AcroPrepTM 96 1 ml filter plate with 1.0 µm Glass Fibermedia, natural housing) в соответствии с протоколом по ДНК-штрихкодированию (Ivanova et al., 2006) или солевым методом (Aljanabi, Martinez, 1997).

Контроль качества выделения проводили на спектрофотометре SPECTRAmax PLUS 384. Показателем чистоты служило значение соотношения коэффициента экстинции при длине волны 260 нм (D260) к значению при длине волны 280 нм (D280). Для измерения от стокового раствора ДНК отбирали аликвоту в количестве 20 мкл и добавляли к 180 мкл деионизованной воды milli-Q. Измерения проводили в кварцевом микропланшете по программе DNA PreRead Method, предварительно сняв фоновые замеры воды в планшете без ДНК.

Одновременно с вычислением концентрации ДНК в образце с помощью программы SOFTmax PRO производился расчет необходимого разведения ДНК для нормализации концентрации ДНК образцов при заданном объеме, а также рабочей концентрации матричной ДНК в последующих молекулярных реакциях.

Между этапами исследований водный раствор ДНК хранили при -20°C.

2.4. Тест на митотипы GUE, BAE, BL

Тест по определению митотипа проводили на следующих выборках: русские осетры Азовского моря — 144 шт., русские осетры Черного моря — 48 шт., русские яровые осетры из Волги — 144 шт., русские озимые осетры из Волги — 48 шт., русские яровые осетры из Урала — 48 шт., русские озимые осетры из Урала — 48 шт., русский осетр из Южного Каспия — 72 шт., персидские осетры из Южного и Среднего Каспия — 78 шт., персидские осетры из Северного Каспия — 86 шт., сибирские осетры из Оби, Лены и озера Байкал по 50 шт.

Определение митотипа особей проводили по методике, разработанной во ВНИРО (Мюге и др., 2008) с использованием постановки мультиплексной ПЦР с видоспецифичными праймерами АНR, AGF, ABF, ABRM с последующим разделением ПЦР-продукта в 2-% агарозном геле (Рисунок 2.3).

Данная ПЦР-реакция мультиплексная – несколько реакций с различных праймеров идут в одной пробирке. В качестве «якорного» для всех видов праймер AR (5'-TATACACCATTATCTCTACTG-3'). использовали опорный Видоспецифичные праймеры GUE-митотипа: **AGF** (5'-ДЛЯ GCACAGACTATGTGGTATCCAGAA-3'), для ВАЕ и ВL митотипов праймер ABF (5'-CAGATGCCAGTAACAGGCTGA-3'). Для разделения данной мультиплексной реакции особей с BAE и BL митотипом был разработан праймер ABRM (5'-TGTCTGTCTAGAACATATG-3').

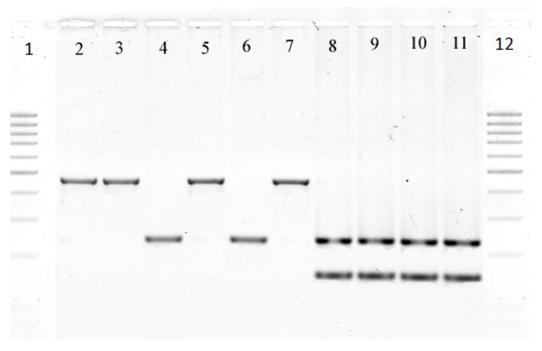


Рисунок 2.3 – Электрофоретическое разделение в 2% агарозном геле ПЦР-продукта с видоспецифичных праймеров в мультиплексной реакции: 2-7 – русский осетр (дорожки 4 и 6 – ВL-митотип), 8-11 сибирский осетр (ВАЕмитотип), 1 и 12 - стандартный маркер длин фрагментов с шагом в 100 п.н. (от 100 до 1000 п.н., Fermentas)

ПЦР-реакцию проводили в объеме 15 мкл при следующих условиях:

1-кратный Таq-буфер (Силекс, Москва), dNTP (Диалат, Москва), 5 пкм праймеров AR, AGF, ABRM, 10 пкм праймера ABF, 2,5U Таq-полимеразы («Силекс», Москва); предварительная денатурация при 95° C - 2 мин., 35 циклов: 92° C - 20° C - $20^$

Разделение продуктов мультиплексной ПЦР проводили с помощью электрофореза. Для этого наносили 8 мкл реакционной смеси с 2 мкл 6-ти кратного буфера для нанесения в 2 %-й агарозный гель с бромидом этидиума в концентрации 0,5 мкг/мл.

Электрофорез проводили в 1-кратном ТВЕ-буфере при 10 В/см². После чего агарозный гель помещали в трансиллюминатор и фотографировали в проходящем УФ-свете (310 нм).

Получаемые в ходе реакции видоспецифичные ампликоны имели следующие размеры:

GUE-митотип – (AGF-AR) – 420 п.н.; сибирский осетр ВАЕ-митотип (1-й ампликон) и русский осетр с BL-митотипом – (ABF-AR) - 220 п.н.; сибирский осетр (ВАЕ митотип) (2-й ампликон) – (ABF-ABRM) – 180 п.н.

Достоверность полученных различий для 95% доверительного интервала по частотам BL митотипа оценивали в речных сборах яровой и озимой рас из Волги и Урала. Сравнение проводилось по одному качественному признаку для выборок разного объема с применением U-критерия.

2.5. Meтод AFLP

Для исследования ядерных маркеров был использован метод AFLP, являющийся разновидностью «фингерпринта» (Vos et al., 1995). Для метода использовались следующие выборки: особи русского осетра азовской (24 экз.) и каспийской популяции (24 экз.), персидского осетра из Южного Каспия (24 экз.) и сибирского осетра из реки Обь (24 экз.).

В методе AFLP на стадии рестрикции ДНК разрезается рестриктазами в определенных сайтах рестрикции на множество фрагментов. В нашем исследовании использовали рестриктазы MspI и EcoR (производство «Fermentas»).

На полученные фрагменты были лигированы (ковалентно пришиты) двунитевые адапторы, и была проведена ПЦР-амплификация с праймеров, комплиментарных последовательностям адапторов, плюс одна буква (преселективная). Нуклеотидные последовательности праймеров даны в Таблице 2.2. Таким образом, были амплифицированы не все рестриктные фрагменты, а только те, которые имеют на концах (перед сайтом рестрикции) определенный нуклеотид. Данная ПЦР называется преселективной. В итоге ПЦР-продукт содержал множество отрезков разной длины, имеющих на концах одинаковую олигонуклеотидную последовательность. Преселективная ПЦР проводилась при следующих условиях: активация при 72°C – 60 сек, предварительный отжиг при $94^{\circ}C - 30$ сек, отжиг праймеров $57^{\circ}C - 60$ сек, синтез цепи $72^{\circ}C - 60$ сек - всего 20циклов, окончательный синтез 72°C 10 мин 30 сек.

Таблица 2.2 – Праймерные последовательности для преселективной ПЦР

Праймер	5'-3' нуклеотидная последовательность
ERpr_A	gactgcgtaccaattcA
Msp_pr_A	gatgagtcctgagcggA

Для последующего снижения количества исследуемых фрагментов ДНК проводили вторую так называемую селективную ПЦР. В качестве матрицы ДНК, с которой идет амплификация, в селективной ПЦР используется ПЦР-продукт преселективной ПЦР, разбавленный в десять раз, а ПЦР идет со специфичных праймеров, имеющих ту же олигонуклеотидную последовательность, что и праймеры преселективной ПЦР плюс еще две буквы, что вынуждает амплифицироваться только те отрезки ДНК, которые помимо заданной

олигонуклеотидной последовательности далее имеют два заданных нуклеотида. Нуклеотидные последовательности использованных нами праймеров даны в Таблице 2.3.

В ходе исследования мы использовали следующие восемь комбинаций селективных праймеров с флуоресцентными метками: 1) ЕсоFAM_AAG - Msp_pr_AAC, 2) ЕсоFAM_ATT - Msp_pr_AAG, 3) ЕсоFAM_ACA - Msp_pr_ACA, 4) ЕсоFAM_AAG - Msp_pr_ACA, 5) ЕсоFAM_ACA - Msp_pr_ACC, 6) ЕсоFAM_ATT - Msp_pr_ACC, 7) ЕсоFAM_AAG - Msp_pr_ACT, 8) Есо-FAM_AAG - Msp_pr_ATC.

Таблица 2.3 – Праймерные последовательности для селективной ПЦР

Праймер	5'-3' нуклеотидная последовательность	Праймер	5'-3' нуклеотидная последовательность
Msp_pr_AAG	gatgagtcctgagcggAag	Msp_pr_ATC	gatgagtcctgagcggAtc
Msp_pr_AAT	gatgagtcctgagcggAat	EcoFAM_AAG	FAM gactgcgtaccaattcAag
Msp_pr_ACA	gatgagtcctgagcggAca	EcoFAM_ATT	FAM gactgcgtaccaattcAtt
Msp_pr_ACC	gatgagtcctgagcggAcc	EcoFAM_ACA	FAM gactgcgtaccaattcAca
Msp_pr_ACT	gatgagtcctgagcggAct	Msp_pr_AAC	gatgagtcctgagcggAac

Селективная ПЦР призвана сократить количество исследуемых отрезков, которые затем визуализируются с помощью капиллярного электрофоретического разделения. Схематичное изображение метода AFLP дано на Рисунке 2.4.

Селективная ПЦР проводилась нами при следующих условиях: плавление при $96^{\circ}\text{C}-10$ мин, предварительный отжиг $94^{\circ}\text{C}-30$ сек, отжиг праймеров $65^{\circ}\text{C}-60$ сек (каждый цикл понижение данной температуры на 0.7°C), синтез $72^{\circ}\text{C}-60$ сек - всего 12 циклов, окончательный синтез 72°C 10 мин 30 сек.

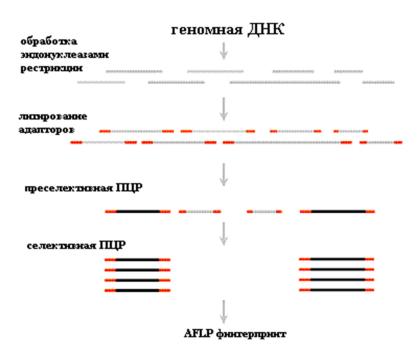


Рисунок 2.4 – Схематичное изображение стадий метода AFLP

Капиллярный электрофорез проводили на приборе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems).

Обработка полученных AFLP-профилей проводилась нами с помощью программы Phoretix 1D Database («Nonlynear Dynamics», Великобритания). Полученная бинарная матрица использовалась для дальнейшей статистической обработки в программе TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis, США). Для оценки частот аллелей был выбран метод, учитывающий доминантную природу Milligan, 1994), позволяющий маркеров (Lynch, работать также тетраплоидными видами (Rodzen, May, 2002). В программе TFPGA по рассчитанным частотам получили матрицу генетических дистанций между исследуемыми популяциями и методом UPGMA (Unweighted-Pair Group Method with Arithmetic Means) построили дендрограмму популяций попарного сравнения дистанций с несмещенной оценкой и учетом размера выборки (Nei, 1978). Для проверки достоверности топологии была рассчитана бутстрэп (англ. "bootstrap") поддержка для каждого узла (1000 пермутаций).

2.6. Анализ однонуклеотидного полиморфизма

На тестовых выборках осетров персидского (72 шт.) и типично русского (82 шт.) морфотипов с исследованной морфометрией далее протестировали частоты SNP локусов, предложенных биоинформатиками на основе результатов работы международного проекта полногеномного RAD секвенирования (NGS) «SturSNP».

Однонуклеотидный полиморфизм (ОНП, англ. Single nucleotide polymorphism, SNP, произносится как снип) — отличие последовательности ДНК размером в один нуклеотид (A, T, G или C) у представителей одного вида или генетически близких видов между гомологичными участками гомологичных хромосом. Анализ такого полиморфизма является одним из методов изучения маркеров ядерной ДНК за счет сравнения частот однонуклеотидных замен.

Однонуклеотидный полиморфизм, как и AFLP, широко используется для построения дендрограмм молекулярно-генетической систематики, идентификации представителей видов и популяций, выявления межпопуляционной и межвидовой генетической дифференциации.

Данный высокоэффективен метод при видовой и популяционной идентификации групп и даже единичных особей, различия в аллельных характеристиках которых являются следствием межгрупповой дифференциации в частотах информативных SNP локусов. Накопление аллельных различий между группами может происходить благодаря межпопуляционной репродуктивной изоляции и дрейфу генов, а может и не быть следствием репродуктивной изоляции, а меняться, например, клинально из-за различных внешних условий среды на протяжении ареала. Поскольку SNP локусы не всегда селективно нейтральны ΜΟΓΥΤ быть частью кодирующей белок нуклеотидной последовательности, а данный белок в свою очередь может влиять выживаемость особи при взаимодействии с внешней средой, то частоты таких локусов могут меняться на протяжении ареала популяции из-за различий в условиях обитания особей на различных географических участках.

При создании дифференцирующей SNP панели локусов, отобранных из множества потенциально информативных маркеров, как правило заведомо отбираются те, которые демонстрируют генетические различия исследуемых выборок. Дальнейшая валидация панели локусов на большей выборке особей может подтвердить найденную дифференциацию или опровергнуть, в случае если дифференциация между малыми выборками была случайной, либо уточнить, например, показав, что вместо фиксации аллелей в разных группах наблюдается выраженная дифференциация в частотах. Таким образом, сильно отобранные SNP локусы могут отражать генетические различия исследуемых групп, которые могут быть следствием реальной репродуктивной изоляции, либо являться следствием селективной природы данных маркеров на фоне различий условий внешней среды на различных участках ареала. В связи с этим, выводы относительно репродуктивной изоляции, популяционной структуры филогенетических связей между группами на основе SNP-анализа делают только на статистически валидных выборках (свыше 30 особей), при подкреплении данными других генетических методов и с учетом анализа особенностей миграционного и нерестового поведения, географического распределения вида и прочих данных его биологии.

Для выявления дифференциации между выборками мы подбирали различные условия ПЦР. Разделение ПЦР продукта проводили с помощью электрофореза. Для этого наносили 8 мкл реакционной смеси с 2 мкл 6-ти кратного буфера для нанесения в 2 %-й агарозный гель с бромидом этидиума в концентрации 0,5 мкг/мл.

Электрофорез проводили в 1-кратном ТВЕ-буфере при 10 В/см². После чего агарозный гель помещали в трансиллюминатор и фотографировали в проходящем УФ-свете (310 нм).

В связи с тем, что плоидность при наследовании данных локусов была неизвестна, далее было решено дополнительно применить метод Primer Extension с использованием 10 уже известных ядерных информативных SNP локусов с

ранее протестированным тетрасомным наследованием, полученных на основании совместной работы с генетической лабораторией Курчатовского института (Rastorguev et al., 2013). Ядерную локализацию локусов проверяли с помощью сопоставления их нуклетидных последовательностей с последовательностями русских осетров из GenBanc с помощью пакета программ Geneious R8. Далее для данных локусов написали праймеры и подобрали условия амплификации. Описание выборок для данной части исследования приводятся в Таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Выборки для метода Primer Extension

Вид или популяция	Происхождение	Выборка (n)
Русский осетр	Средний и Южный Каспий	81
Русский осетр	Северный Каспий	86
Русский осетр	Река Волга	47
Русский осетр	Черноморская популяция	48
Русский осетр	Азовская популяция	48
Персидский осетр	Южный Каспий	96
Персидский осетр	Северный Каспий	81
Сибирский осетр	Река Обь	40
Всего		527

Детекция SNP методом аллель-специфичного удлинения праймера на одно основание (Philip Goelet, Michael R. Knapp, Stephen Anderson, 1999, U.S. Patent No 5,888,819. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office Single base primer extension, Single Nucleotide Polymorphism) состоит в определении идентичности нуклеотида в определенной позиции ДНК.

Олигонуклеотидный праймер гибридизуется с комплементарным участком ДНК и формирует дуплекс таким образом, чтобы 3' конец праймера лежал непосредственно перед основанием SNP локуса матричной ДНК. Праймер энзиматически удлиняется на одно основание в присутствии всех четырех нуклеотидов—терминаторов реакции элонгации. При этом достройка праймера происходит только с тем терминатором, который оказывается комплементарен основанию, находящемуся в позиции SNP на матричной ДНК (Рисунок 2.5).

После включения терминатора в цепь ДНК, дальнейшее ее удлинение становится невозможным, и реакция элонгации ДНК останавливается.

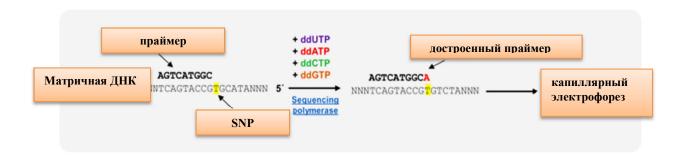


Рисунок 2.5 – Схема детекции SNP методом удлинения праймера на одно основание

Каждый из четырех терминаторов несет в себе ковалентно-связанную молекулу флуорофор, за счет этого по цвету соответствующего пика на полученной хроматограмме (Рисунок 2.6) можно установить генотип исследуемого образца по данному SNP локусу.

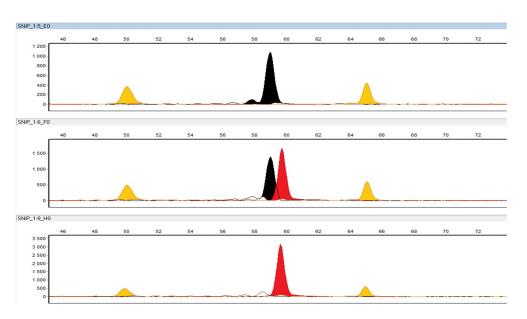


Рисунок 2.6 – Пример хроматограмм, отображающих три возможных генотипа у разных особей русского осетра по локусу L1

Реакцию генотипирования однонуклеотидного полиморфизма (SNP) методом аллель-специфичного удлинения праймера на одно основание проводили в два этапа.

На первом этапе осуществляли амплификацию участка ядерного генома, содержащего детектируемый SNP локус. Реакцию амплификации (ПЦР) (Таблица 2.5) проводили в конечном объеме 10 мкл [1х буфер: 70 мМ Трис-HCl (рН 8.3), 16.6 $(NH_4)_2SO_4;$ 2.5 MgCl₂; 50 мМ мМ мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата; 0.5 пкМоль каждого праймера (таб. 2); 50-100 нг ДНК-матрицы и 1,5 ед. HotTaq-полимеразы («Силекс», Россия) по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 94 °C – 12 мин; 30 циклов (плавление 92 °C -15 сек, отжиг праймеров -62 °C -30 сек, синтез ДНК -72 °C -90 сек), досинтез ДНК при 72 °C – 5 мин.

Таблица 2.5 – Состав реакции амплификации локуса, содержащего однонуклеотидную замену

Компоненты ПЦР	x1, μl
HotTaq буфер (10х)	1
MgCl2 (25 ммоль/литр)	1
dNTPs (2,5 ммоль/литр)	0,2
Смесь праймеров (по 5	1
пмоль прямого и обратного)	
HotTaq полимераза (5	0,3
ед./мкл)	
Деионизованная вода	5
ДНК (25-50 нг/мкл)	2

После завершения ПЦР продукты амплификации семи локусов объединяли в две последующие (мультиплексные) реакции удлинения праймера по следующей схеме: плекс №1 –10 мкл ПЦР продукта локуса L2; 5 мкл ПЦР продукта локусов L1, L8, L7; плекс №2 –5 мкл ПЦР продукта локуса L5; 10 мкл

ПЦР продукта локусов L3, L9, L10; плекс №3 - 5 мкл ПЦР продукта локуса L5; 10 мкл ПЦР продукта локусов L4, L5, L6.

Полученную в результате полимеразной цепной реакции синтезированную ДНК матрицу, содержащую детектируемый SNP-локус очищали от свободных нуклеозидтрифосфатов и праймеров. Для этого к ПЦР продукту добавляли смесь ферментов экзонуклеазы I (ExoI, «Fermentas») и щелочной фосфатазы (FastAP, «Fermentas»), инкубировали при температуре 37 °C 25 минут с последующей инактивацией ферментов при 85 °C в течение 5 минут. После ферментативной продуктам амплификации обработки, добавили 150 смеси ДЛЯ переосаждения ДНК (100 ммоль/литр ацетат 70% натрия, этанол) центрифугировали в течение 30 минут при 2200G, после чего надосадочную жидкость полностью удаляли, а осадок подсушивали.

На втором этапе осуществляют реакцию аллель-специфичного удлинения праймера на одно основание (SBE). Нуклеотидные праймерные последовательности для локусов представлены в Таблице А1 в разделе Приложение А. Реакцию аллель-специфичного удлинения праймера на одно основание проводили в конечном объеме 10 мкл: 1х буфер для SNPdetect полимеразы («Евроген», Россия); 2.5 мМ MgCl2; смесь дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов («Jena Bioscience», Германия), смесь SBEпраймеров, соответствующих локусам, входящим в мультиплекс, в количестве 2,5 пмоль каждый, 1 ед. SNPdetect полимеразы («Евроген», Россия).

Полученную смесь добавляли в лунки, содержащие очищенный и переосажденный ПЦР продукт, а затем помещали в термоамплификатор и проводили реакцию по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 94°С – 3 мин; 200 циклов (плавление 90°С – 3 сек, отжиг праймеров – 58°С – 3 сек, синтез ДНК – 70°С – 3 сек). Полученный в результате реакции SBE продукт очищали от свободных терминаторов. Для этого к продукту добавляли щелочную фосфатазу (FastAP, «Fermentas»), инкубировали при температуре 37°С 25 минут с последующей инактивацией фермента при 85°С в течение 5 минут. После ферментативной обработки, к продукту добавляли 50 мкл смеси для

переосаждения SBE реакции (100 ммоль/литр ацетат натрия, 96% этанол) и центрифугировали в течение 20 минут при 2200 G, после чего надосадочную жидкость полностью удаляли, а осадок подсушивали. К осажденному и очищенному образцу добавляли 10 мкл формамида HiDi («Applied Biosystems»), содержащего внутренний стандарт, проводили денатурацию при 95°C в течение 2 мин и загружали в прибор для проведения капиллярного электрофореза ABI Prizm 3100 («Applied Biosystems»).

Определение длин аллелей осуществляли с применением программного обеспечения GeneMarker (Version 1.2).

Для полученных электрофореграмм по 10 тетрасомным SNP локусам были вычислены дозэффекты и составлена таблица частот для каждой выборки.

Дальнейшая обработка данных проводилась в статистическом пакете для популяционно-генетических исследований Мопрор для R, GenAlex 6.5 и STRUCTURE 2.3.4.

2.7. Секвенирование контрольного региона мтДНК (D-петли)

В рамках работы по генетическому мониторингу молоди осетровых проводили анализ полиморфизма митохондриальной ДНК методом ПЦР с использованием праймеров: DL651 (ATCTTAACATCTTCAGTG) и M13AHR3 (TCACACAGGAAACAGCTATGACATACCATAATGTTTCATCTACC) (Мюге и др., 2008).

ПЦР-реакции содержали около 100 нг ДНК и проводились в объеме 15 мкл (70 мМ Трис-HCl (рН 8.3), 16.6 мМ (NH4)2SO4, 2 мМ MgCl2, по 100 мкМ dNTP, по 1.5 пкМ каждого из праймеров, 1 ед. ColarTaq-полимеразы («Силекс», Москва). Амплификацию проводили по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 95 °C – 10 мин, синтез ПЦР-продуктов (30 циклов): плавление – 94°C – 20 сек, отжиг праймеров – 52°C – 40 сек, синтез ДНК – 72°C – 60 сек, окончательная достройка цепей: 72°C – 10 мин. Визуализацию продуктов ПЦР проводили в 2% агарозном геле в 0.5Х ТВЕ буфере с окрашиванием бромистым этидием.

Секвенирование контрольного региона митохондриальной ДНК проводилось с одной цепи с использованием универсального праймера М13(-22) - TCACACAGGAAACAGCTATGAC (5 пкМ) на с применением набора реактивов ВідDуе^{тм} Terminator Kit v.3.1 («Applied Biosystems», USA) в объеме реакции 10 мкл и с использованием прилагающегося к набору 5X реакционного буфера. В предварительно осажденный ПЦР-продукт в 96-луночном планшете добавляли реакционную смесь: ВідDуе — 0.25 мкл, 5X ВідDуе буфер — 1.7 мкл, праймер М13(-22) -3 пкМ, вода (milliQ) до 10 мкл.

Для секвенирования использовался прибор ABI Prism Genetic Analyzer 3500 («Applied Biosystems»).

Анализ и выравнивание последовательностей проводились с помощью биоинформационного пакета программ SeqMan®. Lasergene 12.0. («DNASTAR. Madison», WI, США).

Метод применяли для генетического мониторинга молоди с целью сопоставления полученного гаплотипа ювенильной особи с базой гаплотипов производителей для проверки возможности приписывания особи согласно схемам скрещивания к той или иной паре осетровых производителей с ОРЗ.

2.8. Проведение микросателлитного анализа

Для проведения генетического мониторинга молоди осетровых применяли панель из шести высоко полиморфных микросателлитных локусов с тетрасомным наследованием (Таблица 2.6) Afug41, Afug51, Afug135 (Welsh et al., 2003), An20 (Zane et al., 2002), AoxD161, AoxD165 (Henderson-Arzapalo et al., 2002). Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресецентные метки приведены в Таблице 2.8. Данная панель локусов показала высокую эффективность для генотипирования осетровых (Барминцева, Мюге, 2013). Для разделения и визуализации полученных фрагментов также использовался капиллярный полиакриламидный электрофорез на приборе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 («Applied Biosystems»).

Реакции амплификации проводили в конечном объеме 15 мкл: (70 мМ Трис_HCl (рН 8.6); 16.6 мМ (NH4)2SO4; 1.8 мМ MgCl2; по 200 мкМ каждого dNTP; 1 пкМ праймера, модифицированного на 5' конце флуоресцентным красителем FAM, HEX или TAMRA; 4 пкМ обратного (немеченного) праймера; 50–100 нг ДНК; 0.8 единиц Таq-полимеразы («Силекс», Москва) по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 94°C – 1 мин; 8 циклов: плавление – 95°C – 20 с, отжиг праймеров – 58°C в первом цикле – 25 с и в каждом последующем цикле температура отжига снижалась на 0.5°C, синтез ДНК – 65°C – 40 с; 25 циклов: плавление – 95°C – 20 с, отжиг праймеров – 54°C 30 с, синтез ДНК – 65°C – 40 с; досинтез ДНК при 65°C – 10 мин. Полученную ПЦР смесь разбавляли в 3 раза водой (milliQ), затем по 1 мкл разбавленной реакции переносили в 12 мкл формамида HiDi с добавленным молекулярным стандартом для определения размера амплифицируемых фрагментов ДНК.

Таблица 2.6 – Микросателлитные локусы для анализа полиморфизма молоди осетровых рыб

Локус	Олигонуклеотид 5'-3'	Метка
	F:AATAACAATCATTACATGAGGCT	HEX
An20	R:TGGTCAGTTGTTTTTTTATTGAT	
	F:TGACGCACAGTAGTATTATTTATG	FAM
Afug41	R:TGATGTTTGCTGAGGCTTTTC	
	F:ATAATAATGAGCGTGCTTTCTGTT	HEX
Afug51	R:ATTCCGCTTGCGACTTATTTA	
	F:GCCAATTCCTGAAATATACCAG	TAMRA
Afug135	R:CGAAACCGCTTCAGACCTT	
	F: GTTTGAAATGATTGAGAAAATGC	FAM
AoxD161	R:TGAGACAGACACTCTAGTTAAACAGC	
	F: TTTGACAGCTCCTAAGTGATACC	TAMRA
AoxD165	R: AAAGCCCTACAACAAATGTCAC	

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в системе капиллярного электрофореза ABI Prizm 3100 («Applied Biosystems»), определение длин аллелей осуществляли с применением программного

обеспечения GeneMarker (Version 1.2). Для определения количественного аллельного состава особи в тетраплоидном локусе, если ее генотип содержит аллели одного размера, мы применяли методику подсчета дозэффекта аллеля.

2.9. Статистическая обработка результатов генетического мониторинга молоди осетровых

последующей обработки полученных нами данных рамках генетического мониторинга для определения осетрового завода, на котором была И выпущена исследуемая ювенильная особь, МЫ разработанную ранее в лаборатории молекулярной генетики ВНИРО программу определения родительской пары для исследуемой молоди для тетраплоидных видов рыб Tetraploid Parentage Analyze вер. 02 (TPA v.02) (операционная система MS Windows). Данная программа дает возможность приписать ювенильной особи к определенной родительской паре по информации о шести микросателлитных локусах и митохондриальному гаплотипу, определенному на основании секвенирования участка контрольного региона мтДНК.

ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Генетический полиморфизм ремонтно-маточных стад волжских ОРЗ

Анализ полученных данных показал высокий генетический полиморфизм маточных стад русского осетра на всех исследованных осетровых заводах.

Идентификация мтДНК гаплотипа самок имеет высокую информационную значимость для целей генетического мониторинга выпускаемого потомства и значительно повышает эффективность используемой панели генетических маркеров. Из 110 самок БОРЗ, для которых получена последовательность мтДНК, нами был выявлен 81 различный гаплотип (гаплотипическое разнообразие Н=0,74). У исследованных 122 самок с ЖОРЗ выявили 84 различных мтДНК гаплотипа (Н=0,69). В стаде производителей КОРЗ у 45 самок выявили 37 различных мтДНК гаплотипов (Н=0,84). У 118 самок СОРЗ выявили 76 различных гаплотипов (гаплотипическое разнообразие Н=0,64). На ЛОРЗ 63 самки несли 52 различных мтДНК гаплотипа (Н=0,82). В стаде производителей АОРЗ у исследованных 60 самок выявили 35 различных мтДНК гаплотипов (Н=0,58).

Значительных различий между заводами и между полами по каждому из микросателлитных локусов не выявили (Рисунок 3.1, по оси X представлены названия аллелей, по оси Y – частоты).

Отсутствие смещений частот аллелей на всех заводах подтверждает соответсвие маточных стад дикой популяции и корректность политики регулярного пополнения ОРЗ Нижней Волги доместицированными дикими роизводителями.

Высокий природный полиморфизм производителей волжских ОРЗ позволяет использовать производителей без ограничения. Близкородственные производители, получение потомства от которых нежелательно по показаниям близкого генетического родства, в составе маточных стад заводов не выявлены.

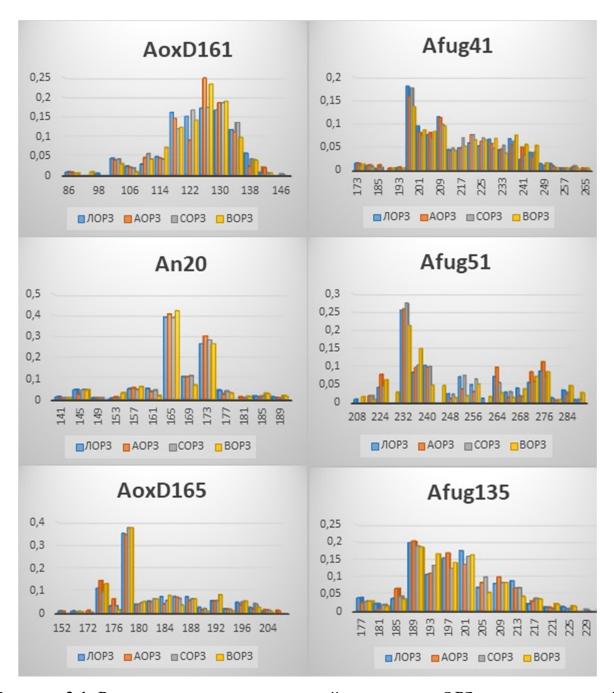


Рисунок 3.1. Распределение частот аллелей по четырем OP3 у производителей русского осетра, отобранных на нерест в 2017 г.

Примеры сопоставления частот аллелей для трех OP3 по данным 2016-2017 гг. представлены на Рисунке 3.2 и на Рисунке 3.3. По оси X представлены названия аллелей, по оси Y – частоты.

Полученные данные подтверждают соответствие стад производителей, исследованных OP3, по уровню генетического полиморфизма природной волжско-каспийской популяции русского осетра.

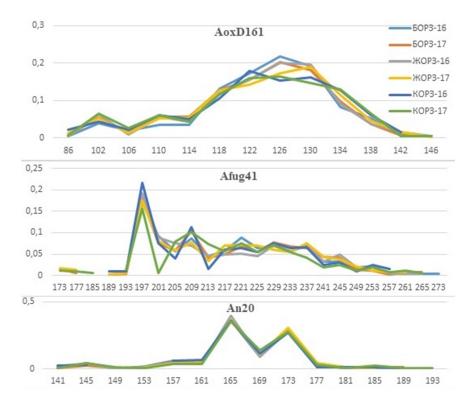


Рисунок 3.2 - Распределение частот аллелей производителей на БОРЗ ЖОРЗ и КОРЗ по локусам AoxD161, Afug41, An20 за 2016-2017 гг.

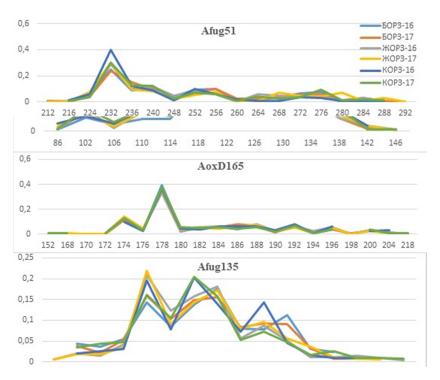


Рисунок 3.3 - Распределение частот аллелей производителей на БОРЗ ЖОРЗ и КОРЗ по локусам Afug51, AoxD165, Afug135 за 2016-2017 гг.

3.2. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК русских, персидских и сибирских осетров на основании сравнения частот митотипов ВАЕ, GUE и BL

На основе оценок, сделанных в более ранних работах (Jenneckens et al., 2000; Мюге и др, 2008; Тимошкина, 2009), при исследовании полиморфизма нуклеотидной последовательности контрольного региона мтДНК русского осетра были описаны следующие митохондриальные гаплотипы: ВL («baerii like», то есть сходный с митотипом сибирских осетров), ВАЕ (настоящий митотип сибирских осетров) и GUE (типичный для русских осетров). Приблизительно треть особей русского осетра в Каспийском море обладает митотипом BL, близким к митотипу ВАЕ. Митотип ВАЕ присутствует у всех представителей всех популяций сибирского осетра. При этом две трети русских осетров в Каспийском море, все особи Азово-Черноморского рыбохозяйственного бассейна генерации до 1975 г., а также все особи персидского осетра обладают GUE митотипом.

Поскольку распределение митотипов ВАЕ, ВL и GUE может быть информативным для определения популяционной и нерестовой структуры вида, в рамках данной работы тест на определение митотипа был проведен на различных выборках, которые предположительно могли относиться к репродуктивно изолированным друг от друга группам и иметь различия в частотах данных митотипов.

Как и ожидалось, три выборки сибирского осетра по 50 шт. из различных популяций — Обско-Иртышской, Ленской и Байкальской — оказались состоящими только из особей с типичным сибирским ВАЕ-митотипом.

Распределение митотипов для русского осетра из Азовско-Черноморского ареала приведено на Рисунке 3.4.

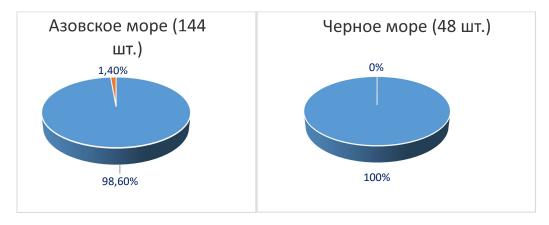


Рисунок 3.4 – Данные на основе ПЦР-теста мтДНК выборок русского осетра из Азовского и Черного морей, синий – частота GUEмитотипа, оранжевый – частота BL-митотипа

Поскольку анализировались современные выборки, собранные после 2000 года, то полученные частоты ожидаемо подтвердили данные, приведенные Тимошкиной Н.Н. (2009) для русских осетров современной генерации азовочерноморского ареала. Авторы предположили, что небольшой процент носителей ВL митотипа, появившийся у русских осетров данного рыбохозяйственного бассейна после 1975 года, связан с искусственным зарыблением данной акватории особями из Каспийского моря, где BL-митотип широко распространен.

генофонда Далее изучения каспийских осетров были ДЛЯ проанализированы частоты встречаемости различных митотипов в выборках русских осетров как из морских сборов, так и из речных сборов озимой и яровой рас из рек Урал и Волга, а также в выборках персидских осетров из сборов в южной, средней и северной части Каспийского моря. Полученные результаты для выборок приведены на Рисунке 3.5, они таже согласуются с частотами, описанными другими исследователями – отсутствие типично сибирского ВАЕособей с примерно треть BL-митотипом русских митотипа, осетров Каспийского отсутствие BLмитотипа персидских осетров (Мюге и др., 2008; Тимошкина, 2009).

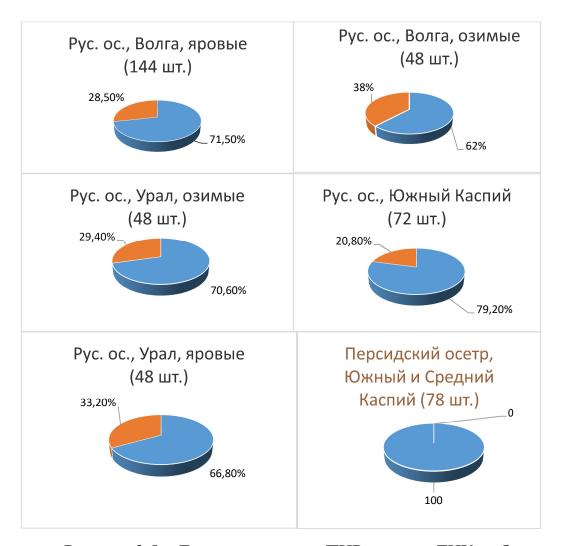


Рисунок 3.5 – Данные на основе ПЦР-теста мтДНК выборок русских и персидских осетров из Волги, Урала и Каспийского моря; синий – частота GUE-митотипа, оранжевый – частота BL-митотипа

Было подтверждено отсутствие BL-митотипа у персидских осетров, GUE-митотип был обнаружен у всех особей в выборках персидского осетра из средней и южной частей Каспийского моря.

Для русских осетров треть особей с BL-митотипом была обнаружена не только в Каспийском море, но также и в речных сборах: озимой и яровой расах рек Урал и Волга.

Достоверность полученных различий для 95% доверительного интервала по частотам BL-митотипа оценили в речных сборах яровой и озимой рас из Волги и Урала. Сравнение проводилось по одному качественному признаку для выборок разного объема с применением U-критерия по Формуле 3.1.

U=
$$(\phi 1 - \phi 2) * (n1n2/(n1 + n2))1/2$$
,
где ϕ =2arcsin(P1/2). (3.1)

Получили U=1,3. По табличным значениям данный параметр не показал достоверных различий между частотами в данных выборках при 95% доверительном интервале.

Таким образом, достоверных различий по частотам BL-митотипа в озимой и яровой расах волжского и уральского русского осетра нами обнаружено не было, и в среднем по всем выборкам Каспийского бассейна у русского осетра такие различия выявляются у 32 % особей.

Проведенный анализ частот митотипов согласуется с предположением о подразделенности вида русский осетр на изолированные генофонды азовскочерноморского и каспийского ареалов, а также указывает на генетическую дифференциацию между русскими и персидскими осетрами каспийского ареала, однако данные выводы требовали подтверждения результатами анализа более информативных маркеров ядерной ДНК.

Сравнение ядерных маркеров выборок русского, персидского и сибирского осетров представлено в разделах 3.3 и 3.5. Возможные причины низкой частоты особей с ВL-митотипом в выборке русских осетров из южной части Каспийского моря рассматриваются также в разделе 3.5. Вопрос возможной морфологической и генетической дифференциации русских и персидских осетров рассматривается в разделе 3.4.

3.3. Межвидовая и межпопуляционная дифференциация русского, персидского и сибирского осетров на основании анализа AFLP локусов ядерной ДНК

Метод AFLP позволяет обнаруживать полиморфизм одновременно в различных геномных областях и может быть применим в ситуациях, когда нет подобранных специфичных маркеров. Поскольку **AFLP** метод высоко чувствителен И хорошо воспроизводим, широко используется ОН ДЛЯ идентификации генетической изменчивости штаммов, близких видов растений, грибов, животных и бактерий и применяется для выявления небольших генетических различий между популяциями и близкими видами (Meudt and Clarke, 2007).

Существует множество преимуществ AFLP по сравнению с другими маркерными технологиями, включая случайную амплифицированную полиморфную ДНК (RAPD), полиморфизм длины рестрикционного фрагмента (RFLP) и микросателлиты, так как AFLP не только имеет высокую воспроизводимость, но также позволяет амплифицировать от 50 до фрагментов за один раз. Кроме того, для амплификации не требуется никакой предварительной информации об изучаемой нуклеотидной последовательности (Meudt and Clarke, 2007).

Поскольку полиморфизм мтДНК консервативен и достаточно хорошо изучен, нас интересовали комбинации праймеров, которые позволяют амплифицировать участки именно ядерной ДНК. Для этого подбирались кандидатные олигонуклеотиды, которые не имеют комплиментарных селективных участков в полных нуклеотидных последовательностях мтДНК осетровых видов. Подходящие для данного теста последовательности мтДНК были взяты из базы GenBank.

В результате селективных и преселективных амплификаций с использованием восьми комбинаций селективных праймеров и последующим разделением фрагментов с помощью капиллярного электрофореза было получено

588 маркеров ядерной ДНК молекулярной длиной от 100 до 380 п.н., из них полиморфными оказалось 79,59%. Данную величину можно сравнить с полиморфизмом из другого исследования, где методом AFLP сравнивались виды Acipenser naccarii, Acipenser transmontanus и их гибриды (Congiu et al., 2002), в этом исследовании полиморфными оказалось приблизительно 70% процентов полученных маркеров. Таким образом, этот уровень полиморфизма для осетров в данном методе можно считать типичным. В полученных нами AFLP-профилях присутствовало небольшое количество мономорфных фрагментов одной длины, дифференцирующих сибирского и русского осетров; различия для выборок русских и персидских осетров выражались только в частотах.

Пример AFLP профилей по одной из восьми комбинаций праймеров представлен на Рисунке 3.6.

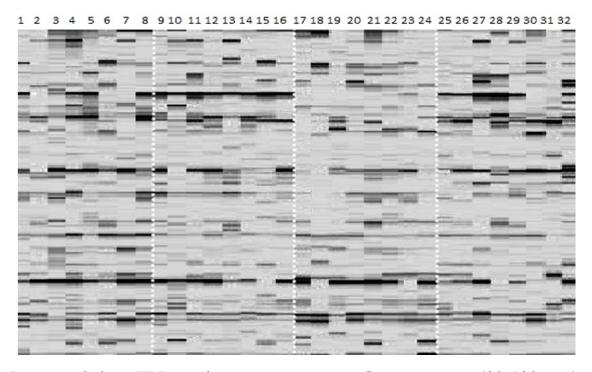


Рисунок 3.6 – AFLP профили из четырех выборок осетров (90-190 п.н.), комбинация праймеров: EcoFAM_ACA, Msp_pr_ACC). (1-8) русские осетры из северной части Каспийского моря; (9-16) русские осетры из Азовского моря; (17-24) сибирские осетры из реки Обь; (25-32) персидские осетры из южной части Каспийского моря

В программе TFPGA оценили генетические дистанции между следующими группами: русский осетр Азовского моря, русский осетр Каспийского моря, персидский осетр южной части Каспийского моря, сибирский осетр (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Матрица генетических дистанций по Нею (Nei's unbiased (1978) distance); выборки: 1 – русский осетр Каспия, 2 – русский осетр Азова, 3 – сибирский осетр, 4 – персидский осетр Южного Каспия

Выборка	1	2	3	4
1	****			
2	0,0105	****		
3	0,0138	0,0213	****	
4	0,0084	0,0136	0,0224	****

На основании полученной матрицы генетических дистанций методом UPGMA была построена дендрограмма. Для проверки достоверности топологии была рассчитана поддержка бутстрэп для каждого узла (Рисунок 3.7).

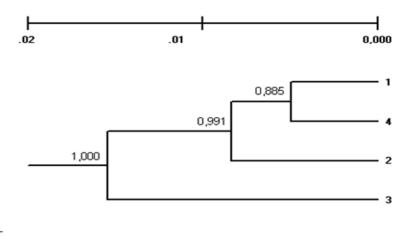


Рисунок 3.7 – UPGMA дендрограмма; выборки: 1 – русский осетр Северного Каспия, 2 – русский осетр Азова, 3 – сибирский осетр, 4 – персидский осетр Южного Каспия; значения поддержки бутстрэп даны в узлах ветвей

На полученной дендрограмме, персидский и русский осетры образуют отдельный кластер по отношению к сибирскому осетру. Это ожидаемый результат, так как сибирский осетр — географически изолированный от Понто-Каспия в течение долгого времени и морфологически хорошо различимый вид. Также на дендрограмме персидский осетр из Каспия образует единый кластер с русским осетром из Каспия, а русский осетр из Азова находится от них отдельно. Для каждого узла полученной топологии наблюдаем высокий уровень бутстрэп поддержки, рассчитанный для 1000 возможных перестановок. Топология считается недостоверной, если уровень бутстрэп поддержки меньше 0,7.

В целом следует отметить низкие генетически дистанции между исследуемыми выборками, что говорит о необходимости большего количества информативных маркеров. По-видимому, требуется применять методы с еще более высоким выходом количества кандидатных маркеров. Например, SNP-анализ после полногеномного секвенирования выборок, где биоинформатические методы позволяют выделить тысячи кандидатных маркеров и провести валидацию на расширенных выборках самых перспективных из них.

3.4. Соответствие морфологической и генетической дифференциации выборок осетров персидского и русского морфотипов из северной части Каспийского моря

В таксономии осетровых рыб особое внимание уделяется меристическим Именно они в первую очередь анализируются большинством полученных исследователей. Для сопоставления результатов прошлых были меристических признаков c исследованиями лет нами использованы различные методы статистической обработки.

В работах по анализу морфометрии широко используется Критерий Стьюдента, позволяющий оценить достоверность различий между выборками по средним значениям с учетом разброса данных. Наши результаты по исследованной выборке приводятся в Таблице 3.2.

При сборе данных подсчитывали количество двух рядов боковых жучек и двух рядов брюшных жучек, поэтому значение N для данных признаков в два раза больше. Согласно полученным данным между русским и персидским осетром наблюдаются достоверные различия по среднему числу боковых и спинных жучек и не достоверные по количеству брюшных жучек.

Для сравнения можно привести данные работы И. А. Сафаралиева, в которой проводился анализ выборок персидского и русского осетров, выловленных в Каспии в течение 2004-2006 гг. (Сафаралиев, 2008) (см. Таблицу 3.3).

Автором приводится общее количество особей N для общей выборки для русского и персидского осетра, поэтому значение N в таблице одно для обоих видов. В целом при сравнении двух таблиц можно увидеть, что полученные результаты практически идентичны.

Таблица 3.2 — Сравнение группы персидского и русского осетров по Критерию Стьюдента; п. о. — персидский осетр, р. о. — русский осетр, М — среднее, min — минимальное значение признака, max — максимальное значение признака, m — стандартная ошибка, tф — значение t-test, N — размер выборок

Признаки	Выборка	M	m	min	max	t-test	N
Число	П. о.	11,5543	0,1578	8	16	tф=4,31768	92
спинных						дост. по 3	
жучек (SD)	P. o.	12,5161	0,1571	10	17	порогу	93
Число боковых	П. о.	29,9277	0,2189	25	39	tф=14,5156	180
жучек (SL)						дост. по 3	
жучек (SL)	P. o.	35,0329	0,2747	26	48	порогу	182
Число	П.о.	9,40760	0,0748	7	12	tф=1,93382	184
брюшных						1 /	
жучек (SV)	P.o.	9,61413	0,0765	7	12	не достов.	184

Таблица 3.3 — Данные И. А. Сафаралиева по меристическим признакам русского и персидского осетров (Сафаралиев, 2008); п. о. — персидский осетр, р. о. — русский осетр, М — среднее, min — минимальное значение признака, max — максимальное значение признака, m — стандартная ошибка, tф — значение t-test, N — размер выборок

Признаки	Выборка	M	m	min	max	t-test	N
	П. о.	11,1	0,1	8	15	tф=5,71	
Спинные						дост.	
жучки (SD)		12,6	0,2			по 3	
	P. o.			10	17	порогу	135
	П. о.	31,1	0,4	23	39	tф=8,26	
Боковые						дост.	
жучки (SL)		36,2	0,5			по 3	
	P. o.			25	43	порогу	135
Брюшные	П. о.	9,6	0,1	7	13	tф=1,61	
жучки (SV)		·	0,1		:	не	
жучки (ЗУ)	P. o.	9,9	0,1	8	12	достов.	135

Наши данные, полученные в другое время и на другом материале, подтверждают результаты исследователя И. А. Сафаралиева относительно различий в меристических признаках русских и персидских осетров.

Помимо критерия Стьюдента для меристических признаков общепринятым в настоящее время является использование теста Ман-Уитни (Mann-Whitney), который также был применен для анализа наших выборок. (См. Таблицу 3.4)

Таблица 3.4 — Тест Ман-Уитни (U критерий) для р <0,05, Π . о. — персидский осетр, P. о. — русский осетр

Признак	Сумм. оценка, П. о.	Сумм. оценка, Р. о.	U	Z	p-level
SD	7083,5	10121,50	2805,5	-4,04347	0,000053
SL	20786,0	44917,00	4496,0	-11,9379	0,00
SV	32019,0	35877,00	14999,0	-1,89057	0,058683

Данные по тесту Ман-Уитни согласуются с оценкой по критерию Стьюдента и показывают достоверное различие между русским и персидским осетровыми морфотипами по среднему числу спинных (SD) и боковых жучек (SL) и отсутствие достоверного различия по среднему количеству брюшных жучек (SV).

Наиболее значимым, как и в предыдущих статистических расчетах, оказывается межгрупповое различие по признаку SL. Значимые различия персидского и русского осетра по SL отмечались различными авторами (Берг, 1961; Артюхин, 2008; Подушка, 2003). Следует отметить, что крайние значения вариативного ряда для персидских и русских осетров перекрываются, данный признак дает четкие различия по среднему и не работает для процента особей, количество жучек которых может быть отнесено как к одному, так и к другому виду. Поэтому для точного определения видовой принадлежности, требуется комплексный подход (Переварюха и др., 2008).

Меристические признаки осетровых описываются практически всеми исследователями персидского и русского осетра со времен Бородина, поэтому мы

имели возможность сопоставить наши данные с данными исследований прошлых лет вплоть до 19 века и убедились, что выявленные закономерности для меристических признаков не являются случайными и многократно описывались различными исследователями применительно русскому и персидскому осетровым морфотипам (Бородин, 1897; Берг, 1961; Бабушкин и Борзенко, 1951; Магерамов, 1972; Путилина, 1983; Митрофанов и др., 1986; Лукьяненко и др., 1990; Артюхин, 2008).

Согласно приведенным данным, несмотря на различные размеры выборок и возможные погрешности, связанные с методическими различиями в подсчетах, одни и те же особенности меристических признаков отмечаются исследователями со времен описания персидского осетра и по настоящее время. Между русскими и персидскими осетрами не наблюдается значительных различий по количеству брюшных жучек (SV), есть небольшие различия по количеству спинных жучек (SD) и выражены различия по числу боковых жучек (SL).

При морфологических описаниях русских и персидских осетров используются также качественные и пластические признаки. Как пример различий на Рисунке 3.8 приводятся фото голов типичных представителей из наших выборок.

При анализе дифференциации выборок по индексам пластических признаков нами был применен дисперсионный анализ ANOVA. Данные по различиям между выборками персидского и русского осетра в 95% доверительном интервале приводятся в Таблице 3.5.





Рисунок 3.8 – Фотографии голов типичного осетра русского морфотипа (сверху) и типичного осетра персидского морфотипа (снизу)

Таблица 3.5 — Дисперсионный анализ ANOVA для пластических признаков выборок персидских и русских осетров

	Коэффициент F(n), где n -	Значение	Достоверность для
Индекс	размер выборки	р	95% интервала
C/L	F(172)=48,574	p=0,0	Достоверно
R/C	F(182)=1,8533	p=0,175	Не достоверно
Sao(Sxp)/C	F(165)=323,49	p=0,0	Достоверно
Sno/C	F(165)=155,62	p=0,0	Достоверно
aD(LD)/L	F(156)=0,427	p=0,514	Не достоверно
Hc/L	F(172)=22,982	p=0,0	Достоверно
Srci/C	F(182)=380,44	p=0,0	Достоверно
SRr/C	F(182)=165,16	p=0,0	Достоверно
Rci/C	F(182)=85,967	p=0,0	Достоверно
Rr/C	F(182)=41,631	p=0,0	Достоверно
Sp/L	F(156)=43,907	p=0,0	Достоверно
Sd/L	F(156)=2,615	p=0,108	Не достоверно
Rci/Rr	F(181)=115,45	p=0,0	Достоверно

По совокупности исследованных морфометрических параметров (меристических и пластических) нами также был проведен анализ в пространстве главных компонент. Полученная диаграмма кластеров двух выборок представлена на Рисунке 3.9.

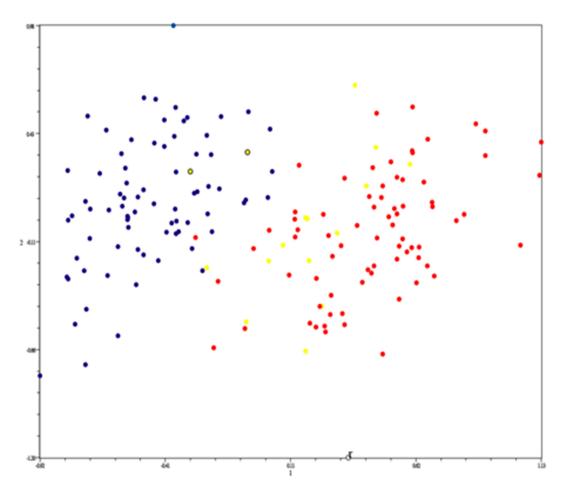


Рисунок 3.9 – РСА, выборки русских (n=82) и персидских (n=72) осетров; синий – персидские осетры, красный – русские осетры, желтый с синей обводкой - персидские осетры с некоторыми признаками русского морфотипа, желтый - русские осетры с некоторыми признаками персидского морфотипа

На представленной диаграмме информация из протокола о популяционной принадлежности особей обозначена цветом точек. Вывод о принадлежности особи делался в полевых условиях на основании габитуса особи, окраски, совокупности пластических и меристических признаков. Результаты данного полевого экспрессопределения принадлежности особи сразу же заносились в протокол.

Согласно полученной диаграмме, персидский морфотип образует обособленный от морфотипа типичного русского осетра кластер по совокупности морфологических признаков. С одной стороны, это показывает морфологическую обособленность двух групп, несмотря на существование небольшого процента переходных форм, а с другой стороны, подтверждает правильность

предварительной оценки видовой принадлежности особей, сделанной до статистической обработки и занесенной в протокол в полевых условиях.

Коэффициенты РСА, отражающие вклад отдельных признаков в дифференциацию, представлены в Таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Коэффициенты РСА для морфометрических параметров для смешанной выборки персидского и русского осетров

Признак	Коэффициент	Коэффициент	Коэффициент
	1	2	3
SD	0,26	0,2234	0,1089
SL1	0,4007	0,1261	0,1352
SL2	0,4009	0,0979	0,0912
SV1	0,1436	0,5376	0,1105
SV2	0,185	0,4782	0,2251
C/L	-0,2553	-0,0531	0,4824
R/C	-0,345	-0,1354	-0,1341
Sao(Sxp)/C	-0,0022	-0,0297	-0,2026
Sno/C	0,0178	-0,012	0,1467
aD(LD)/L	0,3991	-0,2192	-0,1041
Hc/L	0,0209	0,0603	0,0707
Srci/C	0,3706	-0,2234	-0,1901
SRr/C	-0,0622	0,2185	-0,051
Rci/C	-0,0046	-0,1558	0,4865
Rr/C	-0,0103	0,0945	-0,181
Sp/L	0,1609	-0,3407	0,454
Sd/L	0,0206	0,1662	-0,2289
Rci/Rr	0,4029	-0,2418	-0,0539

Согласно данным, приведенным в Таблице 3.6 из исследованных нами морфологических признаков наиболее значимыми для дифференциации двух групп являются: число боковых жучек (SL), отношение антердорсального расстояния (аD) к длине тела (L), отношение ширины рыла у усиков (Srci) к длине головы (С), отношение расстояния от конца рыла до усиков (Rci) к расстоянию от усиков до рта (Rr). Среди совокупности оцениваемых признаков информативным для разделения кластера персидского и русского осетров также оказался индекс Rci/Rr. Примечательно, что в том числе и с использованием индекса по этим признакам были показаны морфологические различия между данными группами в работе Артюхина Е.Н. (2008).

После статистической оценки морфологической дифференциации нами был проведен молекулярно-генетический анализ. В случае правильной видовой идентификации ожидались следующие приблизительные значения частот BL-митотипа: примерно 33% для русских осетров и близкая к нулю частота среди персидских осетров.

Данные по предполагаемым и реально полученным частотам приведены в Таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Ожидаемые и фактически полученные нами частоты в выборках персидского и русского осетра по BL-митотипу

Mondorvy	Количество	Предполагаемые	Фактические
Морфотип	особей	частоты BL	частоты BL
Типичный русский осетр	81		
Русский осетр с			
признаками персидского			
осетра	13	~ 33%	34,20%
Типичный персидский			
осетр	88		
Персидский осетр с			
признаками русского			
осетра	2	$\sim 0\%$	0%

Таким образом, полученные частоты полностью соответствуют ожидаемым на основании предварительной оценки популяционной принадлежности особей по морфологическим признакам. С одной стороны, это подтверждает корректность комплексного использования признаков для видовой идентификации персидского и русского осетров, в том числе в полевых условиях. А с другой стороны, результаты еще раз наглядно подтверждают существования двух данных групп осетров в Каспии.

Помимо различий в маркерах митохондриальной ДНК дифференциация между выборками должна наблюдаться также и между маркерами ядерной ДНК.

Для этой цели отобрали и проанализировали 13 SNP локусов, разработанных в рамках международного проекта SturSNIP. Для каждого подобрали условия ПЦР и провели дальнейшее электрофоретическим разделением в агарозном геле (Рисунок 3.10)

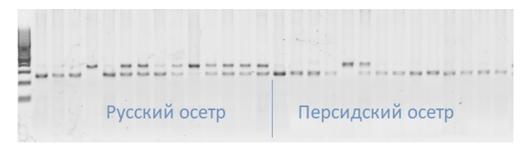


Рисунок 3.10 – Пример разделения в 2% агарозном геле ПЦР продукта по SNP локусу 54644 для русских и персидских осетров

На данных выборках русских и персидских осетров выявили генетическую дифференциацию по аллельным частотам для 7 из 13 ядерных SNP локусов, 5 локусов дифференциацию не показали. Четыре исследованных локуса показали выраженные различия выборок на уровне частот, три локуса показали слабо выраженные различия. Шесть локусов оказались неинформативными для дифференциации. Подробные полученные данные по частотам и условиям ПЦР приведены в виде Таблицы Б1 Приложения Б.

Несмотря на очевидные визуальные различия разделения аллелей, наблюдаемые в агарозном геле, оценка плоидности локусов и возможных частот гетерозигот оказалась затруднительна.

Отдельного упоминания заслуживает найденный ядерный маркер 395AB, который позволил с более чем 96% вероятностью отделить представителей группы русский – персидский – сибирский осетр от других видов осетровых, что может быть полезно при генетической идентификации продукции осетровых гибридного происхождения. Для идентификации особей внутри данной группы видов маркер малоприменим, так как выявил лишь незначительные различия в частотах, что еще раз показало близкие связи внутри данного комплекса осетровых видов.

Результаты данной части исследования, полученные с использованием анализа митохондриальных и ядерных маркеров ДНК, подтвердили наличие генетической дифференциации между выборками персидских и русских осетров из морских сборов Северного каспия. Однако точно оценить уровень данной дифференциации оказалось заструднительно. Для получения более точных аллельных частот и дальнейшей оценки генетических дистанций было решено использовать метод Primer-Extention с применением уже известных тетрасомных SNP локусов с возможностью оценки для них доз-эффекта. Результаты данного анализа приведены в следующем разделе.

3.5. Межвидовая и межпопуляционная дифференциация русского, персидского и сибирского осетров на основании анализа однонуклеотидного полиморфизма ядерных локусов ДНК

Для дальнейшего исследования отобрали нуклеотидные последовательности 10 протестированных SNP локусов с заведомо известным тетрасомным наследованием, показавших по предварительной оценке на малых выборках хорошую межвидовую дифференциацию для русского, персидского и сибирского осетров (Rastorguev et al., 2013).

Поскольку нас интересовали именно ядерные маркеры, так как маркеры митохондриальной ДНК уже относительно изучены для данных видов и популяций, то локусы были дополнительно протестированы в программе Geneious R8. Комплиментарных локусам участков в полной нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК русского осетра обнаружено не было, что подтвердило ядерную локализацию отобранных нами SNP локусов.

Далее для данных локусов были написаны праймеры и подобраны условия ПЦР.

Статистическая обработка полученных данных проводилась двумя общепринятыми методами для анализа тетраплоидных генотипов осетровых. В статистическом пакете для популяционно-генетических исследований Мопрор для R и программе STRUCTURE оценки проводились на тетраплоидной модели. Для оценки в статистическом пакете GenAlex тетраплоидная модель была переведена нами в диплоидную, что является приемлемым подходом при анализе тетраплоидных видов и несколько повышает погрешность анализа, однако сохраняет общие статистические паттерны для исследуемых выборок.

На основе генотипирования 435 особей из 8 выборок нами было получено 343 мультилокусных SNP генотипа. Для всех 10 локусов в STRUCTURE были рассчитаны частоты для каждой выборки. В Таблице 3.8 цветовым переходом выделены значения частот от нулевого значения (темно-зеленый) до 1 (красный).

Таблица 3.8 — Частоты для каждого локуса в каждой выборке, вычисленные в STRUCTURE

Популяция	locus1 (C/T)		locus2 (C/T)		locus3 (C/T)		locus4 (A/G)		locus5 (A/G)	
Gue Casp South	0,644	0,356	0,073	0,927	0	1	0,238	0,762	0,257	0,743
Gue Casp North	0,692	0,308	0,103	0,897	0,068	0,932	0,361	0,639	0,4	0,6
GueVolga	0,712	0,288	0,066	0,934	0,045	0,955	0,268	0,732	0,517	0,483
PersCaspSouth	0,694	0,306	0,113	0,887	0	1	0,122	0,878	0,232	0,768
PersCaspNorth	0,724	0,276	0,118	0,882	0,075	0,925	0,115	0,885	0,186	0,814
GueBlackSea	0,668	0,332	0,108	0,892	0,02	0,98	0,211	0,789	0,296	0,704
GueAzov	0,723	0,277	0,123	0,877	0	1	0,141	0,859	0,409	0,591
BaeOb	0,602	0,398	0	1	0,072	0,928	0,921	0,079	0,791	0,209
Популяция	locus6 (C/T)		locus7 (C/T)		locus8 (A/G)		locus9 (A/G)		locus10 (C/T)	
GueCaspSouth	0,801	0,199	0,075	0,925	0,794	0,206	0,846	0,154	0,833	0,167
GueCaspNorth	0,859	0,141	0,266	0,734	0,732	0,268	0,535	0,465	0,886	0,114
GueVolga	0,9	0,1	0,154	0,846	0,728	0,272	0,432	0,568	0,86	0,14
PersCaspSouth	0,873	0,127	0,078	0,922	0,735	0,265	0,912	0,088	0,791	0,209
PersCaspNorth	0,936	0,064	0	1	0,723	0,277	0,931	0,069	0,576	0,424
GueBlackSea	0,882	0,118	0,05	0,95	0,762	0,238	0,923	0,077	0,357	0,643
GueAzov	0,872	0,128	0,067	0,933	0,754	0,246	0,929	0,071	0,406	0,594
BaeOb		0,628	0,832	0,168	0.202	0,707	0,033		0.400	0,567

К исследованным 10 ядерным SNP локусам добавили информацию по BLтесту митохондриальной ДНК, которая может использоваться в качестве дополнительного маркера для оценки и верификации полученных результатов.

На основании полученных данных была построена дедрограмма генетических дистанций «Provesti's distance», используемая для анализа SNP маркеров (Prevosti, Ocafia, and Alonso, 1975) (Рисунок 3.11).

Наблюдаемая топология совпадает с предполагаемой дифференциацией исследуемых видов и популяций, а высокая бутстрэп поддержка подтверждает валидность полученных данных. Адекватность оценки подтверждают минимальные дистанции, наблюдаемые в кластере русского осетра из Азовского моря и русского осетра из Черного моря, что подтверждает результаты микросателлитного исследования Тимошкиной и коллег (2009), показавших, что данные группы генетически близки друг к другу и являются единой азовочерноморской популяцией. Подтверждает валидность полученных данных и близость выборки осетров, собранных из реки Волги и выборки осетров, собранных в Северном Каспии, также представляющих единую популяцию.

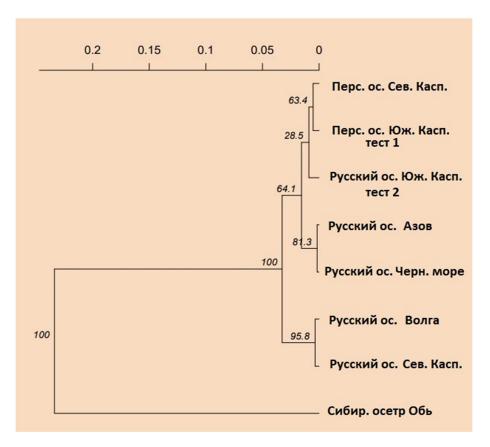


Рисунок 3.11 Кладограмма генетических дистанций на основе анализа однонуклеотидного полиморфизма между исследованными выборками осетровых с указанием поддержки бутстрэп в узлах ветвей (10 000 пермутаций)

Как и ожидалось, самую большую дистанцию со 100 процентной бутстрэп поддержкой наблюдали между кластерами хорошо морфологически различимых групп и давней географической изоляцией – между кластером сибирского осетра и объединенным кластером русский-персидский осетр, что повторяет данные AFLP анализа и говорит о генетической близости русского и персидского осетров. Внутри русского-персидского кластера отдельную кладу образовала северокаспийская популяция. В данной кладе выборка русского осетра из морских сборов Северного Каспия, и выборка русского осетра из речных сборов Волги оказались ожидаемо близки.

Другой кластер по отношению к русским осетрам Северного Каспия и реки Волги, образовали осетры Азовского моря, Черного моря, персидский осетр и русский осетр Южного Каспия. Во всех этих группах ВL-митотип не обнаруживается или имеет минимальную частоту, в то время как в северной

каспийской популяции русского осетра треть особей является носителем ВLмитотипа из-за возможной древней интродукции популяции сибирского осетра в данную акваторию и древней гибридизации с русским осетром, что не могло не оставить след не только в митохондриальном, но и в ядерном геноме русских осетров. Примечательно, что выборки персидского осетра Северного и Южного Каспия отделились в единую кладу, однако, как и в AFLP тесте отдельную кладу по отношению к русскому осетру персидский осетр не образовал, что снова говорит о том, что это молодая форма русского осетра, не накопившая в генофонде генетические различия, превышающие различия между азовской и каспийской популяциями русского осетра.

Вопрос вызывает положение клады русского осетра Южного Каспия, который также оказался в кладе с азовскими осетрами и персидским осетром из Северного и Южного Каспия, а не в кладе с русским осетром Северного Каспия. После подробного изучения генотипов данной выборки причина полученной топологии для выборки русского осетра Южного Каспия была выяснена.

При сопоставлении графиков распределений южно-каспийских генотипов русских (синий цвет на Рисунке 3.9) и персидских осетров (красный цвет на Рисунке 3.12), которые в норме должны иметь куполообразную форму, выяснилось, что график исследуемой выборки русского осетра Южного Каспия имеет две вершины (бимодальный), в то время как остальные выборки, в том числе персидский осетр Южного Каспия, имеют типичные графики нормального распределения генотипов с одной вершиной (унимодальные).

Методологическое отличие сборов материала персидского осетра Северного и Южного Каспия заключалось в том, что выборка Северного Каспия отбиралась нами после детального морфологического исследования с последующей верификацией генетическим тестом на ВL-митотип, что позволило провести достоверную идентификацию особей из смешанной выборки русского и персидского осетров из морских сборов Северного Каспия. В свою очередь, выборка русского и персидского осетров из Южного Каспия была передана нам

ихтиологами, которые проводили экспресс видовую идентификацию в полевых условиях без подробного изучения морфологии.

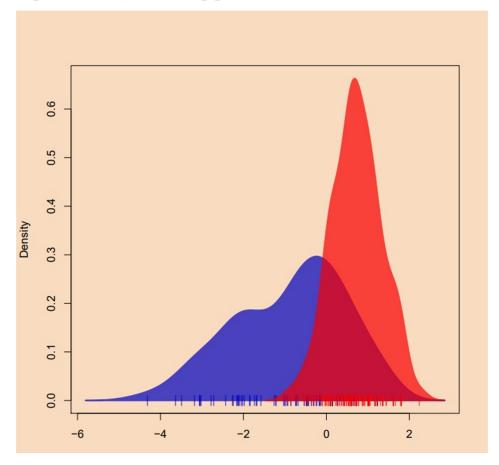


Рисунок 3.12 — Распределение плотности генотипов русского (синий) и персидского (красный) осетра Южного Каспия в зависимости от дискриминантной функции

Возможно, что без детального анализа морфометрии выловленных особей в выборку русского осетра Южного Каспия были записаны особи персидского осетра, поэтому график распределения генотипов данной выборки имеет двугорбую форму, так как на самом деле отражает смесь особей обоих типов. Это подтверждается и ВL-тестом, так как в данной выборке русского осетра присутствует BL-митотип, но не у трети, а только у пятой части особей.

Чтобы проверить данную гипотезу, в программе STRUCTURE нами была составлена диаграмма вероятностей распределения генотипов для каспийских выборок. Изначально мы предположили, что выборки из Каспия можно разделить на две главные генетические группы: персидский осетр и русский осетр. В группу

персидский осетр должна была попасть выборка персидского осетра из морских сборов Северного Каспия и выборка персидского осетра из Южного Каспия, а в группу русского осетра должна была попасть речная выборка Волги, морская выборка русского осетра Северного Каспия, и морская выборка Южного Каспия. Получившаяся двухцветная диаграмма (Рисунок 3.13) отображает красным и зеленым цветом вероятности попадания в первую или вторую генетическую группу для каждой особи выборки. Разрешающая способность полученной рабочей панели SNP локусов позволяет оценить такую вероятность для большинства особей, что дает возможность проверить, состоит ли выборка русского осетра из Южного Каспия из смеси особей русского и персидского осетров.

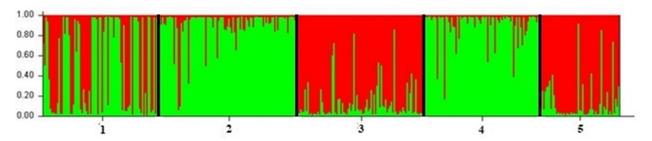


Рисунок 3.13 — Диаграмма вероятностей принадлежности особей осетров из Каспия к двум генетическим кластерам. Красный цвет — генетический кластер русского осетра, зеленый цвет — генетический кластер персидского осетра; нумерация выборок: 1 — русский осетр, Южный Каспий (смешанная выборка); 2-персидский осетр, Южный Каспий; 3 — русский осетр, Северный Каспий; 4 — персидский осетр, Южный Каспий; 5 — русский осетр из реки Волги

Из диаграммы следует, что большинство каспийских выборок состоит из особей, почти однородно принадлежащих к первому или второму типу, погрешность может быть объяснена необходимостью расширения панели локусов для более точной идентификации. Как и предполагалось, персидский осетр Южной и Северной части Каспийского моря относится к одному генетическому типу, а русский осетр из тех же частей ареала — к другому. На Рисунке 3.13 (выполнено в STRUCTURE, метод построения «CLUMPAK main pipeline») наглядно представлено, что выборка русского осетра южной части Каспийского

моря по распределению вероятностей действительно состоит из смеси особей от двух генетических кластеров – русского и персидского типа.

Очевидно, что помимо морфометрии при сборе образцов в дальнейшем в лабораторных условиях необходима последующая генетическая верификации принадлежности выловленных особей.

Поскольку полученная в STRUCTURE диаграмма отображает принадлежность особей к персидскому или русскому осетру, то, основываясь на её данных, мы можем разделить смешанную выборку из Южного Каспия на особей русского и персидского осетра.

Всего 3 процента особей из данной выборки не было однозначно отнесено программой к кластеру персидского или русского осетров. Из группы персидского осетра, выбранного программой, 4 % оказались носителями ВL, что является ошибкой, так как ВL-митотип не встречается в популяции персидского осетра. Поскольку в норме у русского осетра только треть особей — носители ВL-митотипа, то реальная ошибка при дискриминации персидского осетра по данным локусам составляет 4%*3, то есть 12%. К этой ошибке прибавили 3% (особи, которых программа не смогла однозначно отнести к тому или иному типу) и получили примерную оценку ошибки определения персидского и русского осетров из смешанной выборки — 15%.

Можно заключить, что в среднем программа по данной панели SNP локусов корректно определяет видовую принадлежность примерно 85% особей из группы русский-персидский осетр. Расширение панели новыми информативными локусами сделает эту тест-систему еще более эффективной, повысит точность определения и снизит ошибку метода.

Для всех исследуемых выборок персидского, русского и сибирского осетров программа STRUCTURE показала наиболее адекватную диаграмму при K=5. То есть это наиболее вероятное количество генетических кластеров, имеющих между собой выраженные различия по представленным локусам в исследуемых выборках. Общая диаграмма выборок персидского, русского и сибирского осетра с вероятностями для K=5 представлена на Рисунке 3.14.

K=5

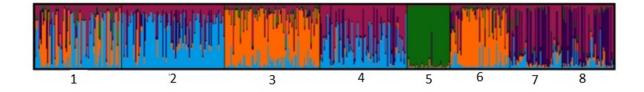


Рисунок 3.14 — Диаграмма вероятностей принадлежности особей русского, сибирского и персидского осетров при K=5. Нумерация выборок: 1 — русский осетр, Южный Каспий (смешанная); 2 - персидский осетр, Южный Каспий; 3 — русский осетр, Северный Каспий; 4 — персидский осетр, Северный Каспий; 5 — сибирский осетр из реки Обь; 6 — русский осетр из Волги; 7 — русский осетр, Азовское море; 8 — русский осетр, Черное море

Ожидаемо четко и обособленно на диаграмме представлен кластер сибирского осетра из реки Обь, выборка 5. Практически идентично выглядят диаграммы выборок 7 и 8 — русского осетра Черного моря и Азовского моря, подтверждая, что русские осетры из данных локаций можно считать единой популяцией. Практически идентично выглядят диаграммы выборок русского осетра из Волги и морских сборов русского осетра из Северной части Каспийского моря. Сходно выглядят диаграммы выборок персидского осетра Северной и Южной части Каспийского моря, и эти выборки также можно отнести к единому генетическому кластеру. В итоге мы выделили 4 генетических кластера, а пятый генетический кластер представлен выборкой русского осетра Южного Каспия, который, как это видно на диаграмме, представляет собой смесь кластеров русского и персидского осетров.

Смешанное происхождение выборки русского осетра Южного Каспия дало объяснение её положению на кладограмме (см. Рисунок 3.8) в общей кладе с персидским осетром вместо ожидаемой кластеризации с русским осетром Северного Каспия. Бустстрэп данной клады оказался самым низким (28,5) среди других клад, где его значения колебались от 63.4 до 100. Это связано с тем, что

программа с трудом смогла достоверно соотнести данную смешанную выборку с той или иной кладой выборок несмешанного состава.

Сходный паттерн пространственного распределения выборок наблюдается в пространстве главных координат (PCA), построенного в пакете GenAlex (Рисунок 3.15). Каждая точка на Рисунке 3.15 представляет собой одну выборку и её пространственное положение по осям зависит от популяционно-генетических параметров данной выборки.

Как и на других диаграммах, удаленно расположена выборка сибирского осетра. По первой оси ближе к сибирскому осетру сгруппированы точки выборок, где встречается ВL-митотип — это выборки русского осетра Волги и русского осетра Северного Каспия. Левее по оси 1 сгруппированы выборки не несущие ВL-митотип, а смешанная выборка, обозначенная нами ранее как выборка русского осетра Южного Каспия, ожидаемо занимает промежуточное положение между выборками персидского и русского осетра.

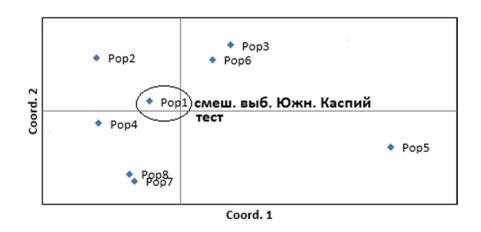


Рисунок 3.15 — Пространство главных координат (PCA) с отображением положения выборок; Рор1 — смешанная выборка Южный Каспий, Рор2 — персидский осетр Южный Каспий, Рор3 - русский осетр Северный Каспий, Рор4 — персидский осетр Северный Каспий, Рор5 — сибирский осетр р. Обь, Рор6 — русский осетр р. Волга, Рор7 — русский осетр Черноеое море, Рор8 — русский осетр Азовское море

Возможно, что такое разделение выборок по ядерным маркерам связано с тем, что русский осетр Каспия несет гены сибирского осетра, что является следствием предположительной древней интродукции последнего после одного через систему постгляциальных оледенений озер из-за нарушения географической изоляции. Поскольку возможные события данной интродукции относятся еще ко времени последних оледенений, то попавшие к особям русского осетра ядерные гены интродуцента равномерно распределились по популяции и в настоящий момент особи, несущие BL-митотип, не отличаются морфологически от особей своей популяции с типичным GUE-митотипом. Это значит, что если выборку одной популяции разделить на подвыборки с BL- и GUE-митотипами и прогенотипировать их по ядерным маркерам, то данные подвыборки будут почти полученным частотам аллелей, неотличимы ПО так митохондриальные гены наследуются независимо. Однако, согласно полученным диаграммам выборка, названная нами русским осетром Южного Каспия, состоит из смеси русского и персидского осетров. Данная выборка была передана для генетических исследований без морфологического описания, поэтому разделить её по морфологическому критерию на русского и персидского осетров теперь невозможно. Однако зная, что BL-митотип встречается только у русского осетра, мы можем отделить этих особей в отдельную подвыборку. После удаления из основной выборки части русских осетров доля персидских осетров в ней возрастет. Это значит, что если наша гипотеза верна, то разделенные таким образом подвыборки на РСА диаграмме сместятся относительно друг друга, а не наложатся – отобранная настоящая выборка русского осетра Южного Каспия станет ближе к группе русских осетров из Северного Каспия, а оставшаяся смесь с возросшей долей персидского осетра сместится на диаграмме к выборкам персидского осетра. Именно это мы и наблюдаем на Рисунке 3.16.

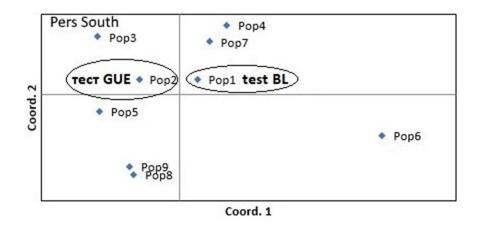


Рисунок 3.16 — Пространство главных координат (РСА) с отображением положения выборок, где смешанная выборка разделена по митотипам; Рор1 — особи с ВL-митотипом из смешанной выборки, Рор2 — оставшиеся особи из выборки Южного Каспия, Рор3 — персидский осетр Южный Каспий, Рор4 — русский осетр Северный Каспий, Рор5 — персидский осетр Северный Каспий, Рор6 — сибирский осетр р. Обь, Рор7 — русский осетр р. Волга, Рор8 — русский осетр Черное море, Рор9 — русский осетр Азовское море

Для того, чтобы проверить предположение о смешанной природе выборки другим способом, на основании дискриминантной функции (независимо от митотипа) по результатам генотипирования было сформировано две подвыборки – персидский генетический тип и типичный русский генетический тип (Рис. 3.17) Снова получили две точки, которые разошлись так же, как и отбор на основании митотипа. Это подтверждает не только смешанную природу выборки, изначально заявленной как русский осетр из Южной части Каспийского моря, но и демонстрирует эффективность анализа как по митотипу, так и по исследованным нами ядерным генам для генетической верификации выборок русских и персидских осетров.

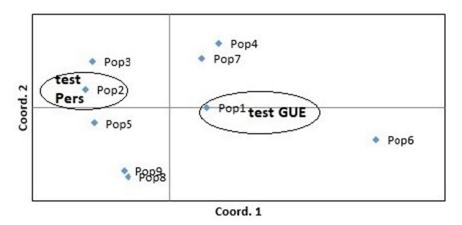


Рисунок 3.17 — Пространство главных координат (РСА) с отображением положения выборок, где смешанная выборка разделена по ядерным локусам; Рор 1 — особи русского генотипа из смешанной выборки Южного Каспия; Рор 2 - особи с персидским генотипом из смешанной выборки Южного Каспия; Рор 3 — персидский осетр, Южный Каспий; Рор 4 - русский осетр, Северный Каспий; Рор 5 — персидский осетр, Северный Каспий; Рор 6 — сибирский осетр, р. Объ; Рор 7 — русский осетр, р. Волга; Рор 8 — русский осетр, Черное море; Рор 9 — русский осетр, Азовское море

Проведенный анализ однонуклеотидного полиморфизма на восьми выборках сибирского, русского и персидского осетров показал перспективность данного метода для разработки тест-системы идентификации популяционной и видовой принадлежности для комплекса сибирский – русский – персидский осетр.

3.6. Современное состояние популяции русского осетра реки Волги на основании данных генетического мониторинга морских и речных выловов сеголетков

При сборе генетических материалов на OP3 во время бонитировок и получения икры нами были исследованы производители осетровых маточных стад и составлена база производителей. Оценка их генетического разнообразия представлена в разделе 3.1.

Далее нами был проведен молекулярно-генетический анализ выборки поступивших из экспедиционных исследований особей сеголетков осетровых по шести микросателлитным локусам с секвенированием фрагмента контрольного участка мтДНК и определением мт-гаплотипа. Гаплотип идентифицировали, основываясь на базе данных мт-гаплотипов осетровых видов рыб, созданной в лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ «ВНИРО».

После обработки в программе TPA_v.02 полученной базы генотипов молоди, собранной в рейсах летом и осенью 2016 года получили следующие результаты. Из 188 штук молоди, отобранной случайным образом для анализа из выборки, пойманной в первом речном рейсе, удалось найти однозначную пару родителей для 133 особей, что составляет 71% от всей выловленной молоди. Распределение идентифицированных сеголеток из экспедиций по заводам представлено в Таблице 3.9.

На круговой диаграмме, построенной по полученным результатам (Рисунок 3.18), отображено, что три четверти проанализированной выловленной молоди практически в равных долях была выпущено с АОРЗ, ЖОРЗ и ЛОРЗ. Оставшаяся четверть — молодь с БОРЗ и СОРЗ. Всего 2 особи были идентифицированы как молодь с КОРЗ. Такая малая представленность этого завода объясняется тем, что КОРЗ расположен не на русле реки Волга, где ведется лов, а на соседней протоке, которая сливается с руслом реки Волга немного выше по течению. Также в улове не была представлена молодь с Волгоградского ОРЗ.

Возможно, к моменту проведения речного рейса, молодь с ВОРЗ еще не успела подойти, так как завод расположен гораздо выше (около 600 км) по течению реки от локаций траления.

Таблица 3.9 – Распределение выловленной речной молоди осетровых по заводам, участвовавшим в весенней нерестовой компании 2016 г.

OP3	Количество молоди, приписанное к ОРЗ				
	Экземпляров	%			
AOP3	32	24			
БОР3	14	11			
ВОР3	0	0			
ЖОР3	34	26			
КОР3	2	1			
ЛОР3	31	23			
COP3	20	15			
Итого:	133	100			

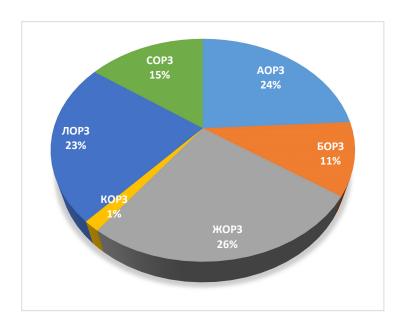


Рисунок 3.18. – Процентное отношение молоди с речного рейса 2016 года, приписанной к различным ОРЗ ФГБУ «Севкаспрыбвод»

Сборы молоди на нагульных банках в Северном Каспии, выполненные с 27 августа по 15 сентября 2016 г. на судне ФГБНУ «КаспНИРХ» «Гидробиолог», выявили 197 особей сеголетков русского осетра. Несколько сеголетков были переданы для анализа после еще одного морского рейса. Всего из 208 особей, пойманных в морских рейсах, однозначно определить происхождение (приписать к ОРЗ) удалось для 152 особей, что составило 76% (Таблица 3.10).

Таблица 3.10 – Распределение молоди осетровых по заводам, участвовавшим в весенней нерестовой кампании 2016 г., и выловленной в морских рейсах

OP3	Количество молоди, приписанное к ОРЗ					
	Экземпляров	%				
AOP3	63	41				
БОР3	19	13				
BOP3	0	0				
ЖОР3	2	1				
КОР3	2	1				
ЛОР3	48	32				
COP3	18	12				
Итого	152	100				

Распределение молоди по заводам на морской съемке представлено на Рисунке 3.17 и отличается от распределения молоди, собранной в речном рейсе по представленности молоди из различных заводов. Если в речном рейсе массово была представлена молодь с АОРЗ, ЛОРЗ и ЖОРЗ, то в морской съемке больше представлена молодь только двух из этих трех заводов – АОРЗ (41%) и ЛОРЗ (32%), в то время как молодь ЖОРЗ представлена всего 1% (2 особи). Значительное присутствие в речном улове молоди Житнинского завода в сравнении с морским уловом можно объяснить тем, что речной рейс проходил в непосредственной близости от завода вскоре после выпуска молоди в реку с

данного ОРЗ. На Рисунке 3.19. представлены диаграммы соотношения всей выловленной молоди к той, происхождение которой удалось определить.

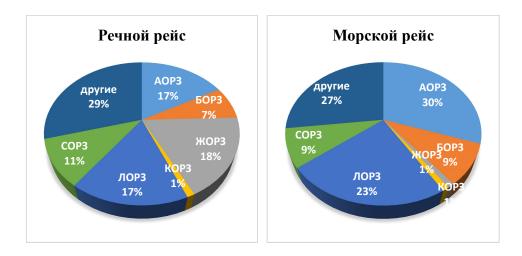


Рисунок 3.19 — Процентное отношение заводской молоди, выпущенной ОРЗ ФГБУ «Севкаспрывод», и молоди с неустановленным происхождением (сегмент - другие), выловленных в рейсах 2016 года

Проведенные исследования показали высокую эффективность генетического мониторинга для молоди осетровых рыб.

Низкая встречаемость молоди, выпущенной с Волгоградского ОРЗ, может объясняться как высокой смертностью молоди в реке, так и более поздним попаданием молоди на кормовые участки Северного Каспия. В этом случае низкая встречаемость молоди в море не свидетельствует о неэффективности ВОРЗ в воспроизводстве, а является методической погрешностью проведенных исследований. Возможно, для достоверной оценки работы ВОРЗ необходимо проводить учет молоди в других квадратах и в другое время. С другой стороны, длительное пребывание молоди ВОРЗ в реке больше соответствует природным характеристикам вида и должно поддерживать адаптационный потенциал русского осетра. Можно предположить, что в дальнейшем, через 7-8 лет, когда производители будут готовы пойти на нерест, потомство ВОРЗ окажется представлено в выборках не менее полно, чем потомство других ОРЗ.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для первоначального изучения популяционной структуры И филогенетических связей русского осетра требовалось подтвердить, что вид всё еще сохранил природный генетический полиморфизм, несмотря на массовое искусственное воспроизводство, осуществляемое с 1960-х годов на ОРЗ Нижней Волги. Проведенные нами исследования маточных стад волжских ОРЗ показали высокий генетический полиморфизм, приближенный к полиморфизму осетров из природной среды, что позволяет виду в целом, несмотря на катастрофическое снижение численности, сохранять природное генетическое разнообразие. Полученные данные подтверждают, высокий генетический нами что популяции полиморфизм волжско-каспийской поддерживается благодаря выпуску молоди от маточных стад волжских ОРЗ, содержащих высокий процент доместицированных диких производителей. Наши результаты подтверждают корректность популяционно-генетических исследований на современных сборах природных выборок русского осетра.

В результате данной работы нами были оценены генетические дистанции по ядерным маркерам ДНК для комплекса трех близких видов — русский, персидский, сибирский осетр. Впервые для решения задач по разделению данного комплекса осетровых видов были использованы методы, позволяющие анализировать полиморфизм ядерных маркеров — SNP и AFLP.

Полученные нами генетические данные подтверждают, что географически изолированный от понто-каспийских осетровых сибирский осетр имеет более древнее происхождение по сравнению с дивергенцией внутри вида русский осетр. Согласно данным молекулярной хронологии (Peng et al., 2007) генетическая изоляция предковых форм сибирского осетра и формирование его как вида начались приблизительно 24 млн. лет тому назад. Наблюдаемые сегодня морфологические отличия, а также генетические особенности сформировались за столь долгий период.

Нами было показано, что дивергенция русского осетра на азовочерноморскую и каспийскую популяции произошла гораздо позднее ухода из Понто-Каспия предков сибирского осетра и, вероятно, было связана с географическим разделением данных бассейнов. Палеогеографическое событие разделения котловин Черного и Каспийского морей, согласно оценкам специалистов, происходило 15-40 тыс. лет назад (Свиточ и др., 1999).

Наши данные по анализу локусов однонуклеотидного полиморфизма выявили сложную популяционную структуру вида русский осетр. Четко выделяются две географически изолированные популяции: азово-черноморская и каспийская. В пределах азово-черноморской популяции не выявлена дифференциация между выборками азовского и черноморского ареала, что позволяет выделять единую азово-черноморскую популяцию.

Сам факт существования в каспийской популяции русского осетра особей с сильно отличающимся митотипом, сходным с митотипом сибирского осетра (BL), может быть объяснен тремя гипотезами.

Первым было выдвинуто предположение (Jenneckens et al., 2000), что данные особи — потомки прямых гибридов русского и сибирского осетров, выпускаемых в Каспий в советское время. После обнаружения в контрольном регионе фиксированной нуклеотидной замены, отличающей ВL-митотип от собственно ВАЕ-митотипа (Мюге и др., 2008), стало очевидно, что это не гибриды, так как тогда в Каспии присутствовал бы непосредственно ВАЕ-митотип, а не похожий на него ВL-митотип, не характерный для сибирских популяций.

Вторая гипотеза (Birstein et.al, 2005) указывает на то, что сибирский осетр является древним выходцем из понто-каспийского осетрового рефугиума, и представляет BL-митотип как часть богатого предкового разнообразия митотипов осетров Понто-Каспия. В таком случае неясно, почему на фоне разнообразия целой сети типично русских митотипов в популяции присутствует низко полиморфный BL-митотип без промежуточных митотипов между ним и GUE-митотипом.

Третья гипотеза (Мюге и др., 2008) связывает появление в Каспии резко отличного от типичных для вида митотипов BL-митотипа с интродукцией одной из древних популяций сибирского осетра, носителей данного митотипа, через систему постгляциальных озер. На момент этого события уже имелась географическая изоляция между Азовом и Каспием, поэтому BL-митотип не был передан осетрам Азово-Черноморского бассейна, а возможная частичная репродуктивная изоляция между русским и персидским осетром не позволила ему попасть в популяцию последнего. Логично предположить, что следы такой интродукции должны были остаться и в ядерной ДНК русского осетра, что дополнительно могло служить источником генетических маркеров дифференцирующих русского осетра Каспия от азово-черноморской популяции и от персидского осетра.

Наличие небольшого количества особей с BL-митотипом в современной азово-черноморской популяции может быть следствием рыбоводных мероприятий по зарыблению Азовского моря каспийскими русскими осетрами с целью увеличения численности осетровых в данной акватории.

В исследованных нами четырех выборках из Волги и Урала средняя частота ВL-митотипа русских осетров составила 32%, и отличалась от выборки русского осетра из южной части Каспийского моря — в ней у русских осетров ВL-митотип присутствует со значительно меньшей частотой — 20,8%. Последующий анализ SNP-локусов показал, что в данной выборке присутствовали помимо русского также и ошибочно определенные персидские осетры, что привело к снижению общей частоты ВL-митотипа. Эти результаты показывают также, что тест на ВL-митотип может быть дополнительно применен для верификации морфологического разделения особей русского и персидского осетров.

Персидский осетр, согласно полученным нами результатам, показал не только морфологическую, но и некоторую генетическую дифференциацию от особей с типичным русским морфотипом, что в будущем может позволить разработать молекулярно-генетические методы по его идентификации. Однако выявленная генетическая дифференциация не является значительной и не

позволяет ему при расчете кластеризации образовать самостоятельную кладу по отношению к популяциям русского осетра. Все найденные генетические различия для персидского осетра носят уровень различий в частотах.

Морфологический анализ ряда меристических и пластических признаков показал достоверное различие между русским и персидским осетрами лишь по средним значениям, однако крайние значения признаков перекрываются.

Очевидно, что обособление персидских осетров от русских осетров, согласно нашим данным, произошло в более поздний период, чем дивергенция русского осетра на каспийскую и азово-черноморскую популяции, что позволяет считать вид персидский осетр очень молодой группой. Однако следует отметить, что обсуждение таксономического ранга персидского осетра не входило в задачи данной работы.

Генетический мониторинг молоди осетровых подтвердил, что современная волжско-каспийская популяция в значительной степени зависит от работы рыбоводных осетровых заводов. Их деятельность в настоящее время помогает поддерживать численность и высокое разнообразие генофонда дикой популяции. В случае если в будущем произойдет снижение качества маточных стад на ОРЗ из-за имбридинга, это может негативно отразиться на сохранении генофонда волжско-каспийских русских осетров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данной работы были исследованы как дикие популяции русского осетра, так и ремонтно-маточные стада волжских ОРЗ, влияющих на состояние генофонда русского осетра. Была выявлена популяционная структура вида и были проанализированы филогенетические связи с близкими видами — персидский и сибирский осетр. Новые найденные молекулярно-генетические маркеры могут быть в дальнейшем использованы для решения прикладных задач в рамках международной конвенции СИТЕС.

Апробация методики генетического мониторинга молоди осетровых подтвердила ее эффективность и целесообразность дальнейшего осуществления.

Результаты работы были представлены на многочисленных международных конференциях, а также опубликованы в англоязычных рецензируемых изданиях, входящих в международные системы цитирования.

выводы

- 1. Высокий уровень генетического разнообразия волжско-каспийской популяции русского осетра сохраняется благодаря высокому генетическому полиморфизму маточных стад на волжских осетровых рыбоводных заводах. Различий между стадами производителей на заводах и между полами по каждому из микросателлитных локусов не выявлено, маточное характеризуется каждое стадо высоким митохондриальным гаплотипическим разнообразием.
- 2. Сравнительный генетический анализ выборок русского, персидского и сибирского осетров по ядерным и митохондриальным маркерам подтвердил генетическую обособленность сибирского осетра от единой группы русского и персидского осетров.
- 3. Выявленный уровень генетических различий между выборками русского и персидского осетров Каспийского моря не превышает уровень различий между выборками русского осетра волжско-каспийской и азово-черноморской популяций, что свидетельствует о более поздней дивергенции персидского и русского осетров.
- 4. Морфологический анализ ряда меристических и пластических признаков показал достоверное различие между русским и персидским осетрами по средним значениям, однако крайние значения признаков перекрываются.
- 5. Генетических различий между популяциями осетра Азовского и Черного морей не выявлено, но можно выделить генетически обособленные каспийскую и азово-черноморскую популяции. В последней обнаружено примерно 1,5 % особей с «baerii-like» митотипом, свойственным каспийской популяции, что свидетельствует о следах недавнего искусственного зарыбления особями из Каспия.
- 6. Популяция Волго-Каспийского рыбохозяйственного бассейна не менее чем на 70% пополняется сеголетками искусственного воспроизводства.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

СИТЕС - Конвенция о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения (CITES);

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;

мтДНК – митохондриальная ДНК;

BAE – «baerii» митотип;

BL - «baerii-like» митотип;

GUE - «gueldenstaedtii» митотип;

АОРЗ - Александровский осетровый рыбоводный завод;

БОРЗ - Бертюльский осетровый рыбоводный завод;

ВОРЗ - Волгоградский осетровый рыбоводный завод;

ЖОРЗ - Житненский осетровый рыбоводный завод;

КОРЗ - Кизанский осетровый рыбоводный завод;

ЛОРЗ - Лебяжий осетровый рыбоводный завод;

СОРЗ - Сергиевский осетровый рыбоводный завод;

ОРЗ - осетровый рыбоводный завод;

п.н. - пары нуклеотидов;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism;

PCA – Principal Coordinates Analysis (анализ пространства главных компонент);

STR - Short Tandem Repeats (микросателлиты);

SNP – Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях (3-е перераб. и дополн. изд.). М.: ИКЦ Академкнига, 2003. 431 с.
- 2. Алявдина Л.А. Состояние и распределение нерестилищ осетра и севрюги на участке р. Волги Саратов Камышин // Тр. Саратов. отд. ВНИРО. 1951. Т. 1. С. 14-31.
- 3. Алявдина Л.А. Биологическая характеристика волжского осетра в период размножения // Тр. Саратов. отд. ВНИРО. 1956. Т. 4. С. 232-253.
- 4. Амирханов Г.А. а. Иммуно-серологическая характеристика осетровых рыб Каспия // Сборник научно-технической информации о достижении рыбной промышленности. 1964. Вып.1. С. 32-35.
- Амирханов Г.А. б. Новые данные о внутривидовой неоднородности рыб Каспийского моря // Рыбное хозяйство. 1964 №8. С. 15-18.
- 6. Амирханов Г.А. в. 1964. Изучение внутривидовых особенностей осетровых рыб Каспия при помощи комплекса иммуно-серологических реакций // Тр. молодых ученых. ВНИРО. 1964. С. 54-57.
- 7. Артюхин Е.Н. Дифференциация популяций персидского осетра и перспективы его заводского разведения на Волге // Биологические основы осетроводства. Сб. статей. 1983. С. 54-61.
- 8. Артюхин. Е.Н. Осетровые. Экология, географическое распространение и филогения. С.Пб: Изд-во СПБГУ, 2008. 136 с.
- 9. Артюхин Е.Н., Андронов А.Е. О внутривидовой дифференциации персидского осетра Волги // Рациональные основы ведения осетрового хоз-ва: тез. докл. конф. Волгоград. 1981. С. 15-16.
- Артюхин Е.Н., Заркуа З.Г. К вопросу о таксономическом ранге осетра реки Риони (бассейн Черного моря) // Вопросы ихтиологии. 1986. Т.26.
 № 1. С. 61-67.

- 11. Артюхин Е.Н., Путилина Л.А. Особенности миграции персидского осетра в низовьях Волги // Рыбное хозяйство. 1985. Вып. октябрь. С. 32-34.
- 12. Бабурина Е.А. Развитие глаз и их функции у осетра и севрюги // Труды института морфологии животных. 1957. Вып. 20. С. 148-186.
- 13. Бабушкин Н.Я., Борзенко М. Осетровые рыбы Каспия. М.: Пищепромиздат, 1951. С.25-45.
- 14. Баранникова И.А. Биологическая дифференциация стада волгокаспийского осетра (в связи с задачами промышленного осетроводства в дельте Волги) // Уч. зап. ЛГУ. 1957. №228. Вып. 44. С. 52-72.
- 15. Баранникова И.А. Гистофизиологические основы внутрипопуляционной дифференциации у рыб. // В кн.: «Обмен веществ и биохимия рыб», М. Наука. 1967. С. 44 537.
- Барминцева А.Е., Н.С. Мюге Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (Acipenseridae) и выявления особей гибридного происхождения. // Генетика. 2013. 49 (9). С. 1093–1105.
- 17. Баранникова И.А. Функциональные основы миграции рыб. Л.: Наука, 1975. 210 с.
- 18. Беляев Е.В. Осетр (Acipenser gueldenstaedti Brand.). Некоторые предварительные данные // Бюллетень всекасп. науч. рыбохозяйственной экспедиции,1932. Вып. 5. С.66-77.
- 19. Беляева В.Н., Ходоревская Р.П. Поведение осетровых на ранних этапах онтогенеза // Труды ЦНИОРХ. 1972. Т. 4. С. 40-51.
- 20. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1933. Ч.П. С.836.
- 21. Берг Л.С. Яровые и озимые расы у проходных рыб // Изв. АН СССР, отд. мат и ест. наук. 1934. №5. С. 711-732.
- 22. Берг Л.С. Зоогеография пресноводных рыб Передней Азии // Уч. зап. ЛГУ. Серия географических наук. 1940. Вып. 3. С. 7-8.

- 23. Берг Л.С. а. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран, часть 1. М.- Л.: изд-во АН СССР. 1948а. 467 с.
- 24. Берг Л.С. б О положении Acipenseriformes в системе рыб. Труды зоологического института. Т.7. М.-Л.: Изд-во АН СССР. 1948б. С. 7-57.
- 25. Берг Л.С. Избранные труды. Ихтиология. Т.4. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1961. С. 218.
- 26. Бирштейн В.Л. Цитогенетические и молекулярные аспекты эволюции позвоночных. М.: Наука. 1987. 284 с.
- 27. Бирштейн В.Я., Васильев В.П. Ядрышковые организаторы, их функционирование и полиплоидия у рыб // Ж. общ. биол. 1987. Т. 48, N 6. C. 729-747.
- 28. Богуцкая Н.Г., Насека А.М. Каталог бесчелюстных и рыб пресных и солоноватых вод России с номенклатурными и таксономическими комментариями. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2004. 389 с.
- 29. Бородин Н.А. Отчет об экскурсии с зоологической целью летом 1895 г. на крейсере «Уралец» в северной части Каспийского моря // Вестн. Рыбопромышленности. 1897. Т.12. №1. С.1-31.
- 30. Бородин Н.А. Идеалы и действительность. Сорок лет жизни и работы рядового русского интеллигента (1879 1919). М.: Изд-во гос. публ. истор. библ. России, 2009. С. 120.
- 31. Быков Н.Е. Озимые биологические группы осетровых р. Урал. // М,: Рыбное хозяйство, 1956. № 4,- С.28 33.
- 32. Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука. 1985. 300 с.
- 33. Васильев В.П., Васильева Е.Д., Шедько С.В., Новомодный Г.В Уровень плоидности калуги *Huso dauricus* и сахалинского осетра Acipenser mikadoi (Acipenseridae, Pisces) // Доклады Академии наук. 2009. Т. 426. № 2. С. 420–433.
- 34. Веселов Е. А. Определитель пресноводных рыб фауны СССР. Пособие для учителей. М., «Просвещение». 1977. 238 с.

- 35. Вишнякова Х.С., Мюге Н.С., Зеленина Д.А., Микодина Е.В., Ковалева О.А., Мадан Г.В., Егоров Е.Е. Культура клеток и кариотип сахалинского осетра Acipenser mikadoi. // Биологические мембраны. 2008. Т.25. № 6. С. 420-433.
- 36. Власенко А.Д Биологические основы естественного воспроизводства осетровых в зарегулированной Волге и Кубани. Автореф. дис... канд.биол.наук. Астрахань. 1982 а.24 с.
- 37. Власенко А.Д. Естественное воспроизводство осетра Волго-Каспия в современных условиях и его роль в формировании промыслового запаса этого вида. // Тез.докл. Всес.конф.по теор. форм. числ. и рацион, использ. стад промысл, рыб. М.,1982 б. С. 104-106.
- 38. Власенко А.Д. Оценка влияния естественных и антропогенных факторов на формирование численности осетровых в Каспийском море // Состояние запасов промысловых объектов на Каспии и их использование. Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2001. С. 26-41.
- 39. Власенко А.Д., Красиков Е.В., Зыкова Г.Ф. Динамика численности и структура стад осетровых в Каспийском море // Состояние запасов промысловых объектов на Каспии и их использование. Астрахань: Издво КаспНИРХа, 2001. С. 41-59.
- 40. Власенко А.Д., Левин А.В., Распопов В.М., Ходоревская Р.П. и др. Состояние промысловых запасов осетровых, мигрирующих в реки России, и прогноз возможной величины прилова осетровых на 2004 год, Рыбохозяйственные исследования на Каспии // Результаты НИР за 2002 год. Астрахань. 2003 г. С. 174-183.
- 41. Вовк Ф.И. Воспроизводство запасов осетровых рыб в нижнем бьефе плотины Волжской ГЭС им. XXII съезда КПСС // Тр. Волгоград, отд. ГосНИОРХ. Т.2. 1966. С. 3-79.
- 42. Гербильский Н.Л. Внутривидовые биологические группы осетровых и значение их познания для развития осетроводства в связи с

- гидростроительством // Труды всесоюзной конференции по вопросам рыбного хозяйства. М.: Изд-во АН СССР, 1953. С. 292-300.
- 43. Гербильский Н.Л., Баранникова И.А., Казанский Б.Н. Посадочный материал для выращивания молоди осетровых // Рыбное хозяйство. 1951. № 9. С. 46-49.
- 44. Гербильский Н.Л. а. Сравнительное исследование проявлений внутривидовой биологической разнокачественности у осетровых в связи с особенностями гидрографии южных рек СССР // Вопросы экологии. 1957а. Т.1. С. 25-32.
- 45. Гербильский Н.Л. б. Пути развития внутривидовой биологической дифференциации, типы анадромных мигрантов и вопрос о миграционном импульсе у осетровых // Воспроизводство рыбных запасов в связи с гидростроительством. Ч.1 // Уч. зап. ЛГУ. 1957б. № 228. С. 11-32.
- 46. Глухов А.А., Скосырский А.Ф. Морфологические особенности гибридов осетровых, мигрирующих в р. Волгу // Касп. плавучий университет. Научный бюллетень. 2000. №1. С.126-127.
- 47. Дементьева Н.В., Терлецкий В.П., Белаш Д.Э., Тыщенко В.И., Яковлев А.Ф. Генетическое разнообразие и дивергенция популяций русского и персидского осетра // Материалы первой научно-практической конференции молодых ученых «Комплексные исследования биологических ресурсов южныйх морей и рек» г. Астрахань, 7-9 июля 2004 г. С. 69.
- 48. Державин А.Н. Воспроизводство запасов осетровых рыб. Баку: Изд-во АН АзССР, 1947. 247 с.
- 49. Державин А.Н. Каталог пресноводных рыб Азербайджана. Баку: Изд-во АН АзССР, 1949. С.7-9.
- 50. Джаваншир А., Могим М., Фегхи Д. Состояние запасов персидского осетра Acipenser persicus Borodin, 1897 у иранского побережья Каспийского моря // Современное состояние и пути совершествования

- научных исследований в каспийском бассейне: мат. междунар. конф. Астрахань: КаспНИРХ, 2006. С. 109-110.
- 51. Дубинин В.И., Котляревская Т.П. К вопросу о морфологических различиях персидского и русского осетров // Осетровое хозяйство водоемов СССР. Краткие тезисы научных докладов к предстоящему Всесоюзному совещанию. Ч.1. Астрахань, 1989. С.84-86.
- 52. Животовский Л.А. Интеграция полигенных систем в популяциях. М.: Наука, 1984. 182 с.
- 53. Казанский Б.Н. Новые данные о рыбоводном освоении куринских осетра и севрюги // Рыбное хозяйство. 1951. № 1. С. 31-36.
- 54. Казанский Б.Н. Экспериментальный анализ сезонности размножения осетровых Волги в связи с явлением внутривидовой биологической дифференциации // Уч. зап. ЛГУ, 311, сер. биол. Вып. 311.1962. С. 19-46.
- 55. Казанский Б.Н. Закономерности гаметогенеза и экологическая пластичность размножения рыб // Экологическая пластичность половых циклов и размножения рыб. 1975. С. 3-32.
- 56. Калмыков В.А., Рубан Г.И., Павлов Д.С. О популяционной структуре стерляди Acipenser ruthenus (Acipenseridae) из нижнего течения Волги // Вопросы ихтиологии, 2009. Т.49. № 3. С. 380-388.
- 57. Карпинский М.Г. Экология бентоса Среднего и Южного Каспия. М.: Изд-во ВНИРО, 2002. 283 с.
- 58. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. 1987. Л.: Наука. 520 с.
- 59. Коробочкина З.С. Распределение осетра и севрюги в Северном Каспии в в зависимости от водности года. // Тр. ВНИРО, 1970. Т.74. С. 82 -107.
- 60. Крылова В.Д., Соколов Л.И. Морфологические исследования осетровых и их гибридов. Методические рекомендации. М.: ВНИРО. 1981. 49 с.
- 61. Кузьмин Е.В. Альбуминовая система сыворотки крови осетрообразных в речной период жизни // Вопр. ихтиол. 1996. Т. 36, № 1. С. 101-108.

- 62. Легеза М.И. Влияние температурного фактора на распределение куринских осетровых. // В кн.: Разработка биологических основ и биотехники развития осетрового хозяйства в водоемах СССР. Астрахань, 1967. С. 27 33.
- 63. Легеза М.И. Разработка биологических основ и биотехники развития осетрового хозяйства в водоемах СССР. Астрахань: Изд-во ЦНИОРХ, 1968. С.27-32.
- 64. Легеза М.И. Количественное распределение осетровых рыб в Каспийском море. // Тр.-ЦНИОРХ. М., 1970. Т.2.С. 57-63.
- 65. Легеза М.И. Современное распределение осетровых рыб в каспийском море. // Вопр. ихтиологии. 1973. Т. 13. Вып. 6 (83). С. 1008-1017.
- 66. Легеза М.И., Войнова И.А. Современное состояние запасов осетровых Каспийско-Куринского района // Осетровые СССР и их воспроизводство. Тр. ЦНИОРХ. 1967. Т.1. С. 26-33.
- 67. Лукьяненко В.И. Внутривидовая дифференциация осетровых и ее значение для рационального ведения осетрового хозяйства. // Тез.отч.сессии ЦНИОРХ, Астрахань, 1973. С. 53-57.
- 68. Лукьяненко В.И. Состояние и перспективы Каспийского осетрового хозяйства в условиях комплексного использования водных ресурсов бассейна // В кн.: Осетровое хозяйство водоемов СССР. Краткие тезисы докл. к Всесоюз. совещ., Астрахань, 1984. С.191 195.
- 69. Лукьяненко В.И. Родовая структура и видовой состав отдельных родов семейства осетровых. // В кн.: Формир. запасов осетр, в условиях комплексн. использ. водных ресурсов. Астрахань, 1986. С. 198 2001.
- 70. Лукьяненко В.И., Седов С.И., Терентьев А.А. Сравнительная иммунохимическая характеристика осетровых Волги и Дуная // Некоторые вопросы осетрового хозяйства Каспийского бассейна. М.: Наука, 1968. С.62-66.

- 71. Лукьяненко В.И. Каратаева Б.Б., Терентьев А.А. Иммуногенетическая специфичность сезонных рас русского осетра. // Доклады АН СССР. 1973.Т.213.№2.С.458-461.
- 72. Лукьяненко В.И., Умеров Ж.Г., Каратаева Б.Б. Южнокаспийский осетр самостоятельный вид рода Acipenser // Известия АН СССР. Сер. Биол. 1974. № 5. С.736-739.
- 73. Лукьяненко В.И., Дубинин В.И., Сухопарова А.Д. Влияние экстремальных условий приплотинной зоны реки на осетровых рыб. Рыбинск. 1990. 272 с.
- 74. Магерамов Ч.М. Появление волжского осетра в р. Куре // Осетровые и проблемы осетрового хозяйства. М.: Пищ. пром., 1972. С.289-293.
- 75. Марти В.Ю. Систематика и биология русского осетра кавказского побережья Черного моря // Зоологический журнал. 1940. Т.19. № 6. С.865-872.
- 76. Митрофанов В.П., Дукравец Г.М., Песериди Н.Е. и др. Рыбы Казахстана. Т.1. Миноговые, Осетровые, Сельдевые, Лососевые, Щуковые. Алма-Ата: Наука, 1986. 272 с.
- 77. Молодцова А.И. Особенности питания русского и персидского осетра в Каспийском море в 2005 г // Современное состояние и пути совершенствования научных исследований в Каспийском бассейне: мат. междунар. конф. Астрахань: КаспНИРХ, 2006. С. 58-61.
- 78. Молодцова А.И. Питание русского и персидского осетра в Северном и Среднем Каспии 2005-2007 гг // Комплексный подход к проблеме сохранения и восстановления биоресурсов каспийского бассейна: мат. докл.. Астрахань: КаспНИРХ, 2008. С. 254-259.
- 79. Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Расторгуев С.М., Мюге В.Н., Барминцев В.А. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика. 2008. Т.44, №7. С.913-919.

- 80. Нельсон Д.С. Рыбы мировой фауны. 4 изд. М.: Книжн. дом «Либроком». 2009. С.159.
- 81. Николюкин Н.И. Отдаленная гибридизация рыб и ее практическое значение // Научные проблемы искусственного разведения проходных и полупроходных рыб и развития товарного рыбоводства. /Тр. совещания по рыбоводству-М., Изд-во АНСССР, 1957. С. 71-80.
- 82. Николюкин Н.И. Гибридизация осетровых рыб // Природа. 1965. №1. C.66-70.
- 83. Николюкин Н.И. Отдаленная гибридизация осетровых и костистых рыб (теория и практика). М.: Пищевая промышленность. 1972. С.253-295.
- 84. Павлов А.В. Анализ динамики нерестового хода и состава стада русского осетра в р. Волге за пятилетие /1975 1979/. // В сб.: «Рацион. осн.веден.осетр.х-ва», Волгоград, 1981. С. 177-179.
- 85. Павлов А.В., Захаров С.С. Распределение, качественный состав и численность осетровых в Северном Каспии в 1967 г. // В кн.: Осетровые СССР и их воспроизводство. М., 1971, С.235-269.
- 86. Пальгуй А.А. Состояние и причины сокращения запасов каспийских осетровых по материалам 1983-1991 гг. // Биологические ресурсы Каспийского моря. Астрахань, 1992. С. 292-297.
- 87. Пашкин Л.М. Некоторые данные об эффективности нереста белуги и осетра в Волге ниже плотины Волжской ГЭС им. XXII съезда КПСС // Тр. Волгоград. отд. ГосНИОРХ. 1967. Т.3. С.271-281.
- 88. Пашкин Л.М. Белуга и воспроизводство ее в условиях зарегулированной Волги: дис. канд. биол. наук. Волгоград, 1969. 22 с
- 89. Песериди Н.Е. Состояние гонад производителей осетра в р.Урал в период нерестовой миграции // Рыбные запасы водоемов Казахстана и их использование. Алма-Ата: Наука, 1966. С.10-30.
- 90. Песериди Н.Е. Сезонная динамика хода осетровых в низовьях р. Урала // Осетровые СССР и их воспроизводство // Тр. ЦНИОРХ. 1971. Т.3. С.355-358.

- 91. Переварюха Ю.Н., Гераскин П.П., Ручьева Т.В., Коробкова Т.С. Процентное соотношение различных популяций осетровых видов рыб в траловых уловах в Каспийском море в 2002 г. (результаты весенней и летней съемок) // Рыбохозяйственные исследования на Каспии: Результаты НИР за 2002 г. Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2003. С. 184-193.
- 92. Переварюха Ю.Н., Гераскин П.П., Переварюха Т.Ю., Петухов К.Е. Вопросы естественной гибридизации осетров (Acipenser gueldenstaedtti Brandt,1833 и Acipenser persicus Borodin, 1897) и других видов семейства Асірепserіdae, обитающих в бассейне Каспийского моря // Комплексный подход к проблеме сохранения и восстановления биоресурсов Каспийского моря в современный период: мат. докл. Астрахань: КаспНИРХ, 2008. С.265-271.
- 93. Пискунов И.А. Распределение осетровых в Каспийском море // Изменение биологических комплексов Каспийского моря за последние десятилетия. М.; Наука, 1965. С.213-233.
- 94. Пискунов И.А. Материалы по биологии осетра и севрюги Каспия в морской период жизни // Тр. ЦНИОРХ. 1970.Т.2.С.74—85.
- 95. Подушка С.Б. Вариабельность числа жучек у русского осетра (Acipenser gueldenstaedti Brandt) реки Дона // Биологические науки. 1988. № 4. С.52-57.
- 96. Подушка С.Б. О систематическом положении азовского осетра // Научно-технический бюллетень лаборатории ихтиологии ИНЭНКО. 2003. Вып. 7. С.19-39.
- 97. Путилина Л.А. а. Количественная и качественная оценка нерестовой популяции персидского осетра в р. Волге // Комплексное использование биологических ресурсов Каспийского и Азовского морей: тез. докл.. М.: ВНИРО, 1983а. С.71-72.

- 98. Путилина Л.А. б. Морфологическая характеристика персидского осетра в р. Волге // Комплексное использование биологических ресурсов Каспийского и Азовского морей: тез. докл. М.: ВНИРО, 1983б. С.70-71.
- 99. Путилина Л.А., Распопов В.М. Миграция осетровых в зимний период в дельте Волги // Осетровое хозяйство водоемов СССР. Тез. науч. докл. к Всес. совещ., Астрахань, 1984. С. 279 280.
- 100. Расс Т.С., Линдберг Г.У. Современные представления о естественной системе ныне живущих рыб // Вопр. ихтиол., 1971, т. 11, вып. 3 (68). С.380-407.
- 101. Распопов В.М, Путилина Л.А, Зимние нерестовые миграции белуги и русского осетра в Волгу // Вопросы ихтиологии. 1989. Т. 29. Вып. 4. С.596-600.
- 102. Реков Ю.И. Динамика численности и структура популяции азовского осетра в условиях изменяющегося режима моря: Дис. канд.биол.наук. М.: АзНИИРХ, 2000. 112 с.
- 103. Реков Ю.И., Корнеев А.А. Эффективность воспроизводства и пополнение промысловых стад азовских осетровых // Воспроизводство запасов осетровых рыб в Каспийском и Азово-Черноморском бассейнах. Сб. научн. тр. М.: ВНИРО. 1987. С. 94-101.
- 104. Рубан Г.И. Сибирский осетр Acipenser baerii Brandt (структура вида и экология). М.: ГЕОС, 1999. 235 с.
- 105. Сафаралиев И.А. Меристические признаки как видоидентификаторы русского (Acipenser gueldenstaedtii) и персидского (Acipernser persicus) осетров Каспийского моря // Комплексный подход к проблеме сохранения и восстановления биоресурсов Каспийского моря в современный период: мат. докл. Астрахань: КаспНИРХ, 2008. С.134-137.
- 106. Сафаралиев И.А., Иванова Л.А., Лепилина И.Н. Состояние запасов персидского осетра (Acipenser persicus Borodin) в Волго-Каспийском районе в современный период // Комплексный подход к проблеме

- сохранения и восстановления биоресурсов Каспийского моря в современный период: мат. докл. Астрахань: КаспНИРХ, 2008. С.137-140.
- 107. Свиточ А.А., Селиванова А.О., Янина Т.А. Новейшая история трёх морей // Природа, 1999. №12. С. 17-25
- 108. Соколов Л.И. Acipenser persicus Borodin, 1897 персидский осетр // Атлас пресноводных рыб России. Т.1. М.: Наука, 2002. С.44-46.
- 109. Субботкин М.Ф., Субботкина Т.А. Иммунохимический анализ антигенов сывороточных белков персидского осетра Acipenser persicus // Вопросы ихтиологии. 1997. Т.38. №4. Июль-август. С.517-523.
- 110. Субботкин М.Ф., Субботкина Т.А. Изучение родственных отношений четырех видов осетров рода Acipenser по антигенам сывороточных белков // Вопросы ихтиологии. 2001. т.41. № 5. Сентябрь-октябрь. С. 656-664.
- 111. Танасийчук В.С. Нерест осетровых рыб в условиях зарегулированного стока Волги // осетровое хозяйство в водоемах СССР. М. 1963.С.138.
- 112. Тимошкина Н.Н. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра // дисс. канд. биол. наук. ФГУП «АзНИИРХ», 2009. 125с.
- 113. Французов Н.Н. Численность нерестовых популяций волжского осетра и регулирование его промысла в современных условиях //Научи, техн. бюлл. ГосНИОРХ. М., 1960. № 2.
- 114. Ходоревская Р.П. Формирование запасов нерестовых частей популяций осетровых, мигрирующих в р. Волгу // Биол. ресурсы Каспийского моря. Астрахань, 1992. С. 445-448.
- 115. Ходоревская Р.П. Значение аквакультуры в формировании запасов осетровых Каспия // Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре. Тез. докл. Международ, симпоз. Краснодар, 1996. С.101-102.
- 116. Ходоревская Р.П., Красиков Е.В., Довгопол Г.Ф., Журавлева О.Л. Ихтиологический мониторинг за состоянием запасов осетровых в Каспийском море // Животный мир. М., 1997. С. 159-163.

- 117. Ходоревская Р.П., Красиков Е.В., Довгопол Г.Ф., Журавлева О.Л. Формирование запасов каспийских осетровьлх рыб в современных условиях // Вопросы ихтиол., 2000. -Т.40, № 5. С. 632-639.
- 118. Ходоревская Р.П. Поведение, распределение и миграции осетровых рыб Волго-Каспийского бассейна. // Автореф. дисс. д-ра биол. наук М.: ИПЭЭ РАН, 2002. 60 с.
- 119. Хорошко П.Н., Власенко А.Д. Характер миграции ранневозрастной молоди севрюги в р. Волге.// Тр. ЦНИОРХ.-М., 1972.-Т.4;.С.52-53.
- 120. Чугунов Н.Л., Чугунова Н.И. Сравнительная промысловобиологическая характеристика осетровых Азовского моря // Осетровые южных морей Советского Союза. Тр. ВНИРО. 1964. Т.52. Сб. 1. С.87-182.
- 121. Шапошникова Г.Х. Биология и распределение рыб в реках Уральского типа. «Наука», М., 1964, С. 176.
- 122. Шилов В.И. Размножение осетровых в верхнем бьефе Волгоградской ГЭС в 1966 г. Вопр. ихтиол. 1968. Т. 8. Вып. 6(53). С. 1102-1106.
- 123. Шилов В.И. Размножение осетровых в Волгоградском водохранилище в 1965 г. Тр. ЦНИОРХа, 1970. Т.2.- С. 151 153.
- 124. Bemis W. E., Birstein V. J., Waldman J. R. 1997. Sturgeon Biodiversity and Conservation. Kluwer Academic Publishers, pp. 25-71, pp. 157-163.
- 125. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt_extraction of high quality genomic DNA for PCR_based techniques // Oxford J. Life Sciences: Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 22. Pp. 4692–4693.
- 126. Bemis W.E., Kynard B. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography ind life history // Environmental Biology of Fishes. 1997. V. 48. Pp.167-183.
- 127. Birstein V.J., Hanner R., DeSalle R. Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches. //In Sturgeon Biodiversity and Conservation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1997. Pp. 127–155.

- 128. Birstein V.J. and DeSalle. R. Molecular Phylogeny of Acipenserinae // Mol. Phylogenet. Evol. 1998. №. 9. Pp. 141–145.
- 129. Birstein V.J.and Doukakis P. Molecular Identification of Sturgeon Species: Science, Bureaucracy, and the Impact of Environmental Agreements // New Perspectives for Monitoring for Migratory Animals International Workshop on Behalf of the 20th Anniversary of the Bonn Convention. Bonn.: 2001. Pp. 47–63.
- 130. Birstein V.J., Doukakis P., Desalle, R. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, Acipenser gueldenstaedtii: forensic and evolutionary implications // Conservation Genetics. 2000. №1. Pp. 81–88.
- 131. Birstein V. J., Ruban G., Ludwig A., Doukakis P., DeSalle R. 2005. The enigmatic Caspian Sea Russian sturgeon: how many cryptic forms does it contain? // Systematics and Biodiversity. 2005. Vol. 3 (2). Pp. 203–218.
- 132. Birstein V.J., Poletaev A.I., Goncharov B.F. DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry // Cytometry. 1993. V. 14. № 4. Pp. 377–383.
- 133. Birstein V. J., Vasiliev V. P. Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the order Acipenseriformes (Pisces). Karyotypes, nucleioli, and nucleolus-organizer regions in four acipenserid spcies // Genetica, V. 72. 1987. Pp. 3-12.
- 134. Blaxter, M. Counting angels with DNA. // Nature421, 2003. Pp. 122-124.
- 135. Chakmehdouz Ghasemi F., Pourkazemi M., Tavakolli M., Yarmohammadi M., Hassanzadeh Saber M., Baradaran Noveiri S. Application of microsatellite markers to determine populations of the Persian sturgeon (Acipenser persicus) in the South of Caspian Sea // Iranian Journal of Fisheries Sciences. 2011. 10(4). Pp. 596-606.
- 136. Congiu L, Fontana F, Patarnello T, et al.: The use of AFLP in sturgeon identification // J Appl Ichthyol. 2002;18(4–6). Pp. 286–289.
- 137. De La Herran R., Fontana F., Lanfredi M., Congiu L., Leis M., Rossi R., Ruiz Rejon C., Ruiz Rejon M., Garrido-Ramos M. A. Slow rates of evolution

- and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons // Mol Biol Evol. 2001. V. 18(3). Pp. 432-436.
- 138. Dingerkus, G. and W.M. Howell, 1976. Karyotypic analysis and evidence of tetraploidy in the North American paddlefish, Polyodon spathula. Science 194(4267). Pp.842-844.
- 139. Fontana F. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces) // Genome. 1994. V. 37(5). Pp. 888-892.
- 140. Fontana F. A cytogenetic approach to the study of taxonomy and evolution in sturgeons. // J. Appl. Ichthyol. 2002. V.18. Pp. 226-233.
- 141. Fontana F., Zane L., Pepe A., Congiu L. Polyploidy in Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. In: Pisano E., Ozof-Costaz C., Foresti F. & Kapoor B.G. (eds.), Fish cytogenetics. Science Publisher, Enfield, Inc. New Hampshire, USA. 2007. Pp. 385–403.
- 142. Fontana F.; Congiu L.; Mudrak V.A., Quattro J.M., Smith T., Ware K., Doroshov S.I. Evidence of hexaploid karyotype in shortnose sturgeon. // Genome. 2008. V. 51. Pp. 113–119.
- 143. Fopp-Bayat D. Inheritance of microsatellite loci in polyploid Siberian sturgeon (Acipenser baerii Brandt) based on uniparental haploids. // Aquaculture Research. 2008. V 39. Pp. 1787–1792.
- 144. Grande L., Bemis W.E. Osteology and phylogenetic relationships of fossil and recent paddlefishes (Polyodontidae) with comments on the inter relationships of Acipenseriformes. // Journal of Vertebrate Paleontology. 1991. V. 11. Pp. 1-121.
- 145. Havelka M., Hulák M., Bailie D.A., Prodöhl P.A., Flajšhans M. Extensive genome duplications in sturgeons: new evidence from microsatellite data // J. Appl. Ichthyol. 2013. V.29(4). Pp. 704–708.
- 146. Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, and J.R. de-Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London, B 270. Pp. 313–322.

- 147. 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. Pp. 437-439.
- 148. Krieger J., Fuerst P. A. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes // Mol. Biol. Evol. 2002. V.19(6). Pp. 891–897.
- 149. Krieger J., Hett A.K., Fuerst P.A., Artyukhin E.N., Ludwig A. The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited. // J. Appl. Ichthyol. 2008. V. 24. Pp. 36-45.
- 150. Ivanova N.V., de Waard J., Hebert P.D.N. An inexpensive, automation_friendly protocol for recovering high-quality DNA // Mol. Ecology Notes. 2006. V. 6. Pp. 998–1002.
- 151. Jenneckens I., Meyer J.-N., Debus L., Pitra C., Ludwig A. Evidence of mitochondrial DNA clones of Siberian sturgeon, Acipenser baerii, within Russian sturgeon, Acipenser gueldenstaedtii, caught in the River Volga. // Ecology Letters. 2000. V. 3(6), Pp. 503-508.
- 152. Jenneckens I., Meyer J.-N., Hörstgen-Schwark G., May B., Debus L., Wedekind H., Ludwig A. A fixed allele at microsatellite locus LS-39 exhibiting species-specificity for the black caviar producer Acipenser stellatus // J. Appl. Ichtiol. 2001. V. 17. Pp. 39-42.
- 153. Le Comber S.C., Smith C. Polyploidy in fishes: patterns and processes. // Biological journal of the Linnean society. 2004. V. 82. Pp. 431-442.
- 154. Ludwig A., Belfiore N.M., Pitra C., Svirsky V., Jenneckens I. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus). // Genetics. 2001. V.158. Pp. 1203–1215.
- 155. Lynch M., Milligan B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. // Mol Ecol. 1994; 3(2). Pp. 91–99.
- 156. Mable B.K., Alexandrou M.A., Taylor M.I. Genome duplication in amphibians and fish: an extended synthesis. // Journal of Zoology. 2011. V. 284(3). Pp. 151-182.

- 157. Meudt H.M., Clarke A.C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances // Trends Plant Sci. 2007 Mar;12(3). Pp. 106-117.
- 158. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. // Genetics. 1978; 89(3). Pp. 583–590.
- 159. Peng Z., Ludwig A., Wang D., Diogo R., Wei Q., He S. Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes). // Mol. Phylogenet. Evol. 2007. V.42 (3). Pp. 854-862.
- 160. Prevosti A., Ocafia J. and Alonso G. // Distances between populations of Drosophila subobscura, based on chromosome arrangements frequencies. Theoretical and Applied Genetics, 1975, 45. Pp. 231-241.
- 161. Rastorguev S., Mugue N., Volkov A., Barmintsev V. Complete mitochondrial DNA sequence analysis of Ponto-Caspian sturgeon species // J.Appl.Ichthyol. 2008. Pp. 1-4.
- 162. Rastorguev S.M., Nedoluzhko A.V., Mazur A.M., Gruzdeva N.M., Volkov A.A., Barmintseva A.E., Mugue N.S., Prokhortchouk E.B. High-throughput SNP-genotyping analysis of the relationships among Ponto-Caspian sturgeon species // Ecol Evol. 2013 Aug; 3(8). Pp.2612-8.
- 163. Raymakers C. CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora: its role in the conservation of Acipenseriformes // J. Appl. Ichthyol. 2006. V. 22(1). Pp. 53–65.
- 164. Rodzen J. and May B., Inheritance of microsatellite loci in white sturgeon (Acipenser transmontanus) // Jan. 2003 Genome 45(6). Pp. 1064-76.
- 165. Rodzen J.A., May B. Inheritance of microsatellite loci in the white sturgeon (Acipenser transmontanus). Genome. 2002. V.45(6). Pp. 1064-1076.
- 166. Ruban G.I., Kholodova M.V., Kalmykov V.A., Sorokin P.A. Morphological and Molecular genetic study of the persian sturgeon Acipenser persicus Borodin (Acipenseridae) Taxonomic Status// Journal of Ichthyology, 2008, Vol. 48, №10. Pp. 891–903.

- 167. Ruban G.I., Kholodova M.V., Kalmykov V.A., Sorokin P.A. A review of the taxonomic status of the Persian sturgeon (Acipenser persicus Borodin) // J. Appl. Ichthyol. 27 (2011), Pp. 470–476.
- 168. Schreier A., Gille D., Mahardja B., May B. Neutral markers confirm the octoploid origin and reveal spontaneous autopolyploidy in white sturgeon, Acipenser transmontanus. // J. Appl. Ichthyol. 2011. V. 27(2). Pp. 24-33.
- 169. Schultz R.J. Role of polyploidy in the evolution of fishes. // Basic Life Sci. 1979. V. 13. Pp. 313-340.
- 170. Tagliavini J., Conterio F., Gandolfi G., Fontana F. Mitochondrial DNA sequences of six sturgeon species and phylogenetic relationships within Acipenseridae // J. Appl. Ichthyol. 1999. V. 15(4-5). Pp. 17-22.
- 171. Van Eenennaam A.L., Murray J.D., Medrano J.F. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of white sturgeon, Acipenser transmontanus Richardson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very high chromosome number. // Genome. 1998. V. 41. Pp. 51–61.
- 172. Vasil'ev V.P. Mechanisms of Polyploid Evolution in Fish: Polyploidy in Sturgeons Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons Fish & Fisheries Series. 2009. V. 29. Pp. 97-117.
- 173. Vasil'eva E.D., Morphological Data Corroborating the Assumption of Independent Origins within Octoploid Sturgeon Species // J. Ichthyol. 44 (Suppl. 1), 2004. Pp. 63–72.
- 174. Vasil'eva E.D., Vasil'ev V.P., Shedko S.V., Novomodny G.V. Huso (Acipenseridae) Based on Recent Morphological and Genetic Data with Particular Reference to the Kaluga H. dauricus. // Journal of Ichthyology. 2009. V. 49(10). Pp. 861–867.
- 175. Vasil'ev V.P., Vasil'eva E.D., Shedko S.V., Novomodny G.V. How many times has polyploidization occurred during Acipenserid evolution? New data on the karyotypes of sturgeons (Acipenseridae, Actinopterygii) from the Russian Far East. // Journal of Ichthyology. 2010. V. 50(10). Pp. 950-959.

- 176. Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. // Nucleic Acids Res. 1995; 23(21). Pp. 4407–4414.
- 177. Welsh A.B., Blumberg M., May B. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, Acipenser fulvescens, and their variability in green sturgeon, A. medirostris. // Molecular Ecology Notes. 2003. V.3. Pp. 47-55.
- 178. 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. Pp.586-588.

Приложение А

Таблица A1 – Праймерные нуклеотидные последовательности для локусов однонуклеотидного полиморфизма для метода Primer Extension

Локус	Олигонуклеотид	Олигонуклеотидная последовательность (5'-3')			
L1	праймер F	GTGTCCGGGGTGCTGAGAAG	C/T		
	праймер R	GCACAGTCTTTCGTGCCAGC			
	SBE праймер	GCCGTATAACTTCAAGAACAGAAAACTAAG			
L2	праймер F	AAGAACGGCACCTGGGTTGA	C/T		
	праймер R	AAAACAGGACTTTATTCTGGCTTGACC			
	SBE праймер	(T)9-CCCATACGAGTTCATGGCGTAAAGCA			
1_3	праймер F	AGGAACGCACCTAGGTCTA	C/T		
	праймер R	ACGAGTGAACTATATTGAGGCTTGGTA			
	SBE праймер	GTAGTCCCAACGAGGTCCTTGGCGTAGA			
<i>A</i>	праймер F	GGAACACTGGCTAAACCCGC	A/G		
	праймер R	CACCAGCCTCCCTCATTGCT			
	SBE праймер	(T)18-CAGGTGGAATCGTAGACGTTTACCGAG			
2.5	праймер F	TCTACCCTGCTGGTGGT	A/G		
	праймер R	ACTGCCAGCATTGTTTCTTGGC			
	SBE праймер	(T)30-ATTCCTCCTTCCAGAGTCGCA			
.6	праймер F	TGCCTGCAATGGGACTGTGA	C/T		
	праймер R	TGCTCCTCCTTAGCCAAGCC			
	SBE праймер	(T)30-GCAGATATTCTTGCGCTGATCACCCTG			
2.7	праймер F	TACGTGCAATGGTACTGGGA	C/T		
	праймер R	TGTTCCTACTTATGCAAGAC			
	SBE праймер	(T)20-GAAGTTATTCAAGCGCTGATCTCCTTG			
2.8	праймер F	GCAACACAGGCTCAACAAGC	A/G		
	праймер R	CGAAAGCTTCCTTCATTGAT			
	SBE праймер	TCACCTGGTAACGTAGACGTCTACGCAG			
<u>_</u> 9	праймер F	CAATGCTGCAGCCTCCAGTG	A/G		
	праймер R	CTGCCAGGCTCAATGTGCTG			
	SBE праймер	(T)18-AATGATGGGTGTCACCGTATATGAAGG			
L10	праймер F	GGCAGAGCCGTAGAAGAGGG	C/T		
	праймер R	CTTGGCGCGGATGTGAGTTC			
	SBE праймер	GGACATGATCCGCGAGGTGTG			

Приложение Б

Таблица Б1 — Результаты подбора условий и теста SNP локусов. Зеленый цвет — хорошая амплификация и дифференциация, бледно-зеленый — слабо выраженная дифференциация, светло-желтый — неработающий или мономорфный локус, белый — локус 395AB

Локус	Праймеры	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3')	t отж. (°C)	Длина ПЦР прод. (пн)	Частоты аллелей
54644	Pr54644G	TGTTCACCCCCACATCCAGAAtCC	62	245	Персидкий осетр: P=0,09, G=0,91
	Pr54644P	TGTTCACCCCACATCCAGAAtGT	60	245	Русский осетр: P=0,5, G=0,5
	Pr54644R	AGAAACATCTGCTACAAATCAAGGATTAC			
56275	Pr56275G	CGCAGTTGCCCAACaA	58		
	Pr56275P	CGCAGTTGCCCAACaG	56	194	
	Pr56275R	CGAGTAAAACAGGAGGCTTC			
61036	Pr61036G	TCATGATGCAGGACATGGaA	59		
	Pr61036P	TCATGATGCAGGACATGGaG	58	215	
	Pr61036R	CCCTGCACATCCTGACTC			
62734	Pr62734G	ATTGTGAGACACTCTACACTCACGaT	58		Персидкий осетр: P=0,52, G=0,48
	Pr62734P	ATTGTGAGACACTCTACACTCACGaA	58	377	Русский осетр: P=0,12, G=0,88
	Pr62734R	GTCCCAGTTGCTGTCCC			

Локус	Праймеры	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3')	t отж. (°C)	Длина ПЦР прод. (пн)	Частоты аллелей
63741	Pr63741G	AGCTGAAGCACTGCAGCtT	62	396	Персидкий осетр: P=0,45, G=0,55
	Pr63741P	AGCTGAAGCACTGCAGCtC	62		Русский осетр: P=0,52, G=0,48
	Pr63741R	GGACAGGGTCAGCATGTAC			
	Pr64242G	ATTATTATTATTAGCAGAaG	48		
64242	Pr64242P	ATTATTATTATTAGCAGAaA	48	176	
	Pr64242R	GGTACTTTACCTAGATTG			
	Pr64614G	GTCAGCCTGAGCTCACaA	58	264	
64614	Pr64614P	GTCAGCCTGAGCTCACaC	57		
	Pr64614R	CTGGCTAATATCGACCCCT			
65770	Pr65770G	CTGGTTAGTCCAGGGCAATATCAaT	60	267	Персидкий осетр: P=0,61, G=0,39
	Pr65770P	CTGGTTAGTCCAGGGCAATATCAtA	63		Русский осетр: P=0,65, G=0,35
	Pr65770R	GTGGTACGCCACATGTAACTTC			
65774	Pr65774G	CCACTGACCTTCAGTTATAGCGtG	61	275	Персидкий осетр: P=0,61, G=0,39
	Pr65774P	CCACTGACCTTCAGTTATAGCGtT	63		Русский осетр: P=0,34, G=0,66
	Pr65774R	CCCCATGAGCCTACCAC			
65790	Pr65790G	CCCAGGAGAAAGCAGAaC	58	349	
	Pr65790P	CCCAGGAGAAAGCAGAaA	56		
	Pr65790R	GGGAAAGAACTGTCAGGC			

Локус	Праймеры	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'-3')	t отж. (°C)	Длина ПЦР прод. (пн)	Частоты аллелей
	Helen10 R1	CACGTGGATGAATGTTGAAGTTCATAG	62		Персидкий осетр: P=0,82 G=0,18
Helen10	Helen10 R2	CACGTGGATGAATGTTGAAGTTCATAA	56	271	Русский осетр: P=0,81, G=0,19
	Helen10 F	TCCAACTCTAACGCTATGTTGTTCAATT			
Helen14	Helen14 R1	TTCTGAATGGTCGAGAGGCAGGCCTAG	66		
	Helen14 R2	TTCTGAATGGTCGAGAGGCAGGCCTAT	56	148	
	Helen14 F	CCAGGGTACTCTGTTCCCATTACTTG			
Helen15	Helen15 R1	GAATGGAGAAAACATATATTCACAGTAT	53	200	Персидкий осетр: R1=0,55, R2=0,45
	Helen15 R2	GAATGGAGAAAACATATATTCACAGTAC	52		Русский осетр: R1=0,13, R2=0,87
	Helen15 F	TTTTAATGTATTCTGCATGCTGTTG			
395AB	395_AB	CCACAAAACAACAAAACATATGGAG	54		Персидкий осетр: Р=0,45
	395_uni	CCTTGGGCTAGTCTTCATGCC	57	395	G=0,55 Русский осетр: P=0,96,
					G=0,04
					Сибирский осетр: P=0,99, G=0,01