

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии»
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

На правах рукописи

БАРМИНЦЕВА
Анна Евгеньевна

**ФИЛОГЕОГРАФИЯ И ВНУТРИВИДОВОЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
ПОЛИМОРФИЗМ СИБИРСКОГО ОСЕТРА
ACIPENSER VAERII BRANDT, 1869
В ПРИРОДЕ И АКВАКУЛЬТУРЕ**

Специальность 03.02.07 – Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к. б. н. Мюге Н.С.

Москва, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Характеристика осетровых рыб	12
1.2 Геномная организация осетровых	16
1.3 Об уровне ploидности генома осетровых	17
1.4 Полиморфизм митохондриальной ДНК	19
1.5 Полиморфизм микросателлитных локусов	23
1.6 Генетическая идентификация гибридов осетровых	26
1.7 Популяционно-генетическая структура осетровых	29
1.8 Сибирский осетр - биология, внутривидовая структура	32
1.9 Современное состояние и введение сибирского осетра в аквакультуру	34
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1 Сбор образцов	38
2.2 Молекулярно-генетический анализ	42
2.2.1 Выделение ДНК	42
2.2.2 Секвенирование контрольного региона мтДНК	43
2.2.3 Проведение микросателлитного анализа	44
2.2.3.1 Определение доз эффекта аллеля в микросателлитном локусе	46
2.2.3.2 Постановка мультиплексной ПЦР	53
2.3 Статистическая обработка данных	54
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	56
3.1 Выбор микросателлитных локусов и характер их наследования	56
3.2 Межвидовая дифференциация сибирского осетра и других близкородственных видов	79
3.2.1 Идентификация видоспецифичных аллелей	79
3.2.2 Определение видовой принадлежности осетровых (assignment test) с использованием полиморфизма микросателлитных локусов	86
3.3 Природный генетический полиморфизм сибирского осетра и	90

филогеография	
3.3.1 Исследование митохондриальной ДНК	90
3.3.2 Анализ полиморфизма микросателлитных локусов	96
3.3.3 Филогеография сибирского осетра	103
3.4 Генетический полиморфизм сибирского осетра в аквакультуре	106
3.4.1 Исследование митохондриальной ДНК	106
3.4.2 Анализ полиморфизма микросателлитных локусов	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ВЫВОДЫ	118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	120
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	121
ПРИЛОЖЕНИЕ	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Осетровые рыбы представляют большой интерес для изучения генетических и эволюционных процессов. Предполагается, что осетровые рыбы (Отряд Acipenseriformes) появились около 200 млн. лет назад во время юрского периода (Grande, Bemis, 1991, Bemis et al., 1997). В настоящее время почти все осетровые находятся на грани исчезновения в связи с чрезмерной эксплуатацией и потерей привычной среды обитания и естественных нерестилищ (Рубан, 1999; Ходоревская, 2002; Ходоревская, Романов, 2006; Палатников, Касимов, 2008; Ludwig, 2008; Калмыков, Рубан, Павлов, 2009). Эти "живые ископаемые" важны для понимания эволюции позвоночных в целом, однако, если общество не предпримет решительных мер для их спасения, остается не так много времени для их изучения. В настоящее время в России промышленный и любительский лов осетровых запрещен (за исключением некоторых популяций стерляди и сибирского осетра в р. Лена), а вылов осуществляется только для целей воспроизводства и научных исследований. Весь род включен в списки Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения (CITES) (Raymakers, 2006), а также осетровые внесены в различные категории Международной Красной книги (IUCN) (Birstein et al., 1997, Raymakers and Hoover, 2002).

Такое резкое снижение численности за относительно короткий период времени диктует необходимость изучения генетической составляющей их популяций, в том числе сибирского осетра, в недавнем прошлом промыслового вида, а в настоящее время самого востребованного из осетровых видов рыб для аквакультурного разведения как в России, так и за рубежом. (Williot et al., 2001; Bronzi et al., 2011; Bronzi, Rosenthal, 2014) На настоящий момент, искусственное воспроизводство осетровых в нашей стране является основным источником пополнения естественных популяций. В связи с этим мероприятия по

поддержанию численности вида должны учитывать сохранение его устойчивости, в значительной мере обусловливаемой его генетической гетерогенностью, и, соответственно, требуют знаний об эволюционно сформировавшейся популяционной структуре вида. Область генетических исследований, направленная на сохранение и поддержание исчезающих видов или видов, численность которых нарушена из-за перелома, антропогенной и хозяйственной деятельности человека, выделяется в настоящее время в отдельную научную дисциплину, называемую природоохранная генетика (conservation genetics) (DeSalle et al., 2004). Методы и подходы, применяемые в природоохранной генетике, позволяют избежать непоправимых ошибок в деле восстановления утерянного поголовья осетровых видов рыб по всему ареалу их обитания.

Генетические исследования, проводимые ранее на осетровых видах рыб, выявили ряд особенностей, такие как замедленный консервативный характер кариологической (Lanfredi et al., 2001; Chicca et al., 2002), биохимической (Khabarov et al., 2002) и молекулярной (de la Herran et al., 2001; Krieger et al., 2000; Krieger, Fuerst, 2002) эволюции, а также полиплоидию - увеличенное количество хромосом в кариотипе осетровых (число хромосом варьирует от 116 до 360 у разных видов). (Birstein et al., 1993; Ludwig et al., 2001; Kim et al., 2005; Fontana et al., 2007; Вишнякова и др., 2008; Fontana et al., 2008; Васильев и др., 2009; Vasil'ev, 2009).

В современной систематике, наряду с морфологическим и биохимическим анализом, широко используются методы оценки генетического полиморфизма с помощью молекулярных маркеров. В литературе имеются данные по оценке полиморфизма некоторых видов осетровых рыб с помощью AFLP и микросателлитного (STR) анализа (Jenneckens et al., 2001; King et al., 2001; Congiu et al., 2002; Zane et al., 2002; Henderson-Arzapalo, King, 2002; Welsh et al., 2003; Барминцева, Мюге, 2013).

Сибирский осетр также является объектом изучения как по митохондриальным (Мюге и др., 2008; Birstein et al., 2009), так и по ядерным маркерам, но, в основном, как объект аквакультуры и получения гибридных

линий осетровых. (Forr-Bayat, Luczynski, 2006; Georgescu et al., 2013; Rajkov et al., 2014; Havelka et al., 2014). Природный же полиморфизм сибирского осетра по генетическим маркерам изучен явно недостаточно.

Для сибирского осетра были описаны несколько подвидов: – *A. baerii baerii* (западносибирский осетр, Обь-Иртышский бассейн), *A. b. stenorhynchus* Nikolskiy, 1896 (узкорылый осетр, река Енисей), *Acipenser baeri chatys* Drjagin, 1948, (якутский, или ленский осетр, река Лена и реки к востоку от Лены до р. Колымы и Индигирка, часто синонимизировался с узкорылым осетром) и *A.b. baikalensis* (оз. Байкал и впадающие в него реки Селенга и верхняя Ангара) (Богуцкая, Насека, 2004, Sokolov, Vasilev, 1989). Дальнейшее изучение сибирского осетра показало значительную внутривидовую морфологическую изменчивость при отсутствии выраженных отличий между осетрами Оби, Енисея, Байкала и Лены, что послужило основанием распространенного мнения о необоснованности выделения подвидов (Ruban, 1997; Рубан, 1998; Рубан, 1999; Ruban, 2005).

Исследование природного генетического полиморфизма сибирского осетра имеет непосредственное значение как для разработки мер по охране и восстановлению природных популяций этого вида, так и для развития аквакультуры. Несмотря на то, что деление сибирского осетра на подвиды в современной литературе некоторыми авторами оспаривается, при проведении работ по искусственному воспроизводству необходимо поддержание и сохранение генетического полиморфизма каждой популяции.

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы – оценка внутри- и межпопуляционного генетического полиморфизма сибирского осетра по всему ареалу его обитания и в аквакультуре с использованием ядерных (STR) и митохондриальных (D-loop) маркеров и разработка практических рекомендаций по сохранению популяционных генофондов вида.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить характер наследования и полиморфизм ранее опубликованных микросателлитных локусов и оценить приемлемость их использования для молекулярно-генетического популяционного анализа на экспериментальных скрещиваниях.
2. Создать панель наиболее информативных, воспроизводимых и полиморфных локусов для анализа популяционно-генетической структуры сибирского осетра.
3. Изучить с использованием созданной панели микросателлитных локусов межвидовую дифференциацию сибирского осетра и близких к нему видов, таких как русский, персидский осетры и другие виды осетровых рыб.
4. Изучить внутри- и межпопуляционную генетическую изменчивость природных популяций сибирского осетра по ядерным и митохондриальным маркерам.
5. Провести филогеографический анализ сибирского осетра на основе полиморфизма митохондриальной и ядерной ДНК.
6. Оценить генетический полиморфизм аквакультурных стад сибирского осетра в европейской части России и Западной Сибири.

Научная новизна работы

Впервые проведено комплексное исследование сибирского осетра с использованием современных молекулярно-генетических методов – анализа полиморфизма ядерной и митохондриальной ДНК. Выборки, используемые в работе, представляют большую часть современного ареала вида. Оценен уровень полиморфизма и показана значимая дифференциация четырех природных популяций сибирского осетра из пяти исследованных. Показано, что популяции озера Байкал и реки Енисей, относимые ранее к разным подвидам, не имеют значимой генетической дифференциации. По результатам анализа предложена

гипотеза о рефугиуме в оз. Байкал, в котором вид пережил период последнего оледенения европейской части России и Западной Сибири и впоследствии расселился по современным сибирским рекам. Оценен уровень падения генетического полиморфизма при искусственном выращивании сибирского осетра в аквакультуре. Впервые даются рекомендации по сохранению популяционных генофондов этого вида с позиций природоохранной генетики.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты вносят новые знания в эволюционную систематику и филогению рода *Acipenser* и вида *Acipenser baerii*. Предложен набор генетических маркеров, который используется для индивидуальной и массовой генетической паспортизации производителей сибирского осетра на осетровых рыбоводных заводах европейской части России и Западной Сибири. Полученные данные важны при искусственном разведении вида, требующем учета популяционно-генетической структуры по правилам природоохранной генетики. Полученные результаты включены в базу данных, использование которой осуществляется при видовой, популяционной и индивидуальной идентификации особей при проведении различных рыбоводных и природоохранных мероприятий, способствующих сохранению генетического разнообразия и адаптивного потенциала вида, а также при проведении генетического мониторинга искусственного воспроизводства сибирского осетра, осуществляемого в настоящее время на осетровых рыбоводных заводах системы Росрыболовства и на частных предприятиях, а также при определении законности происхождения продукции из осетровых рыб.

Положения, выносимые на защиту

1. Сибирский осетр в большинстве случаев ведет себя как тетраплоид, но по некоторым локусам может быть охарактеризован как октаплоидный вид и может

образовывать нехарактерные гексаплоидные формы, особенно часто возникающие при аквакультурном разведении.

2. Сибирский осетр представляет собой дифференцированную популяцию, подразделенность которой поддерживается за счет географической изоляции сибирских рек друг от друга, однако популяции оз. Байкал и реки Енисей пока не имеют значимой дифференциации в связи с возможностью миграции особей между этими бассейнами через реку Ангара в недалеком прошлом до постройки плотины.

3. У сибирского осетра в условиях аквакультуры происходит значительное падение генетического полиморфизма как по ядерным, так и по митохондриальным маркерам, что ведет к потере гетерогенности популяции и, как следствие, адаптивного потенциала.

Личное участие автора

Все этапы работы: планирование работы, участие в сборе образцов, пробоподготовка, молекулярно-генетический анализ и статистическая обработка, анализ и систематизация полученных результатов, выполнены автором лично.

Апробация работы

Основные положения и результаты работы были представлены для обсуждения научной общественностью на многих конференциях в виде тезисов и устных докладов: научно-практическая конференция «Водные биоресурсы России: решение проблем их изучения и рационального использования» (Москва, 11 сентября 2003 г.), международный симпозиум «Холодноводная аквакультура: старт в XXI век» (Санкт-Петербург, 8 – 13 сентября 2003 г.), IV международная научно-практическая конференция «Аквакультура осетровых рыб, достижения и перспективы развития» (Астрахань, 13-15 марта 2006 г.), IX международный симпозиум «Генетика в аквакультуре» (Монпелье, Франция, 25-30 июня 2006 г.),

2-ой воркшоп (рабочая встреча) специалистов по осетрам группы IUCN (Берлин, Германия, 29 сентября-1 октября 2006 г.), 6-ой международный симпозиум по осетровым видам рыб (Вухан, Китай, 25-31 октября), международная конференция, посвященная памяти профессора, доктора биологических наук Валентина Сергеевича Кирпичникова (Санкт-Петербург, 2013), 2-ая международная научная конференция «Воспроизводство естественных популяций ценных видов рыб» (Санкт-Петербург ФГБНУ «ГосНИОРХ», 16-18 апреля 2013 г.), международная научная конференция „Актуальный статус и охрана исчезающих натуральных популяций осетровых рыб” (Огонки -Гижицко, Польша, 8 - 11 апреля 2014 г.), вторая научная школа молодых ученых и специалистов по рыбному хозяйству и экологии с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения И.Б. Бирмана (Звенигород, 19-25 апреля 2015 г.), международное совещание по осетровым ISM-2016 (Краснодар 01-05 июня 2016 г.), международная научная конференция, посвященная 80-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова и 45-летию основанию лаборатории популяционной генетики им. Ю.П. Алтухова ИОГен РАН. «Генетика популяций: прогресс и перспективы» (Звенигородская биологическая станция им. С.Н. Скадовского Биофака МГУ им. М.В. Ломоносова, 17-21 апреля 2017 г.), 8 международный симпозиум по осетровым рыбам (ISS8), (Вена, Австрия, 10-16 сентября 2017 г.), III международная конференция "Современные проблемы биологической эволюции" в Государственном Дарвиновском музее (Москва, 16-20 октября 2017 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ в журналах, соответствующих перечню ВАК, 1 брошюра и 1 глава в книге "The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869)", 2 патента и 27 тезисов конференций.

Работа поддержана следующими грантами:

1. Грант РФФИ 16-14-00221 "Генетические основы успешной аквакультуры осетровых и лососевых рыб".

2. Грант РФФИ 15-29-02766 "Комплексное генетическое исследование осетровых: геномная организация, филогения и разработка методов генетического мониторинга восстановления природных популяций в Российской Федерации."

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 145 страницах, содержит 23 рисунка, 32 таблицы и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Библиография включает 193 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика осетровых рыб

Осетрообразные рыбы (*Acipensireformes*) распространены в бассейнах морей, озер и рек Европы, Азии и Северной Америки. Предполагается, что они появились около 200 млн лет назад во время Юрского периода (Grande, Bemis, 1991; Bemis et al., 1997) и постепенно эволюционировали в сторону современных *Acipensireformes* (Яковлев, 1977). Миллер (1969) упоминал, что ископаемые остатки осетровых обнаружены в верхнемеловых отложениях в Северной Америке, самые ранние найденные окаменелости осетровых относятся к позднему мелу (85 млн лет) (Hilton, Grande, 2006). Однако же, отношения сестринских групп между *Acipenseridae* и *Polyodontidae*, в сочетании с наличием окаменелостей веслоноса (*Polyodon spatula*) из позднего мела, и некоторых вымерших таксонов (род *Protopsephurus*) осетрообразных из верхнеюрского и раннемелового периодов (Lu, 1994) подтверждают гипотезу, что осетрообразные намного старше (Grande, Bemis, 1996; Peng et al., 2007). Несмотря на древность происхождения и примитивное строение, до сравнительно недавнего времени осетровые занимали огромный ареал, охватывающий почти все Северное полушарие (Васильев, 1985). В наши дни их ареал не столь широк (Pikitch et al., 2005; Ludwig, 2008).

Осетровые рыбы - это долгоживущие низшие позвоночные, продолжительность жизни может быть более 100 лет, хотя в настоящее время такие долгожители уже не встречаются в естественной среде обитания (Соколов, Цепкин, 1996). Осетровые имеют поздние сроки созревания (от 5 до 30 лет в зависимости от вида) и нерестятся далеко не каждый год (имеют от 2 до более 10 лет между последующими нерестами). (Макаров, 1970 а,б; Pikitch et al., 2005).

Отряд осетрообразных (*Acipenseriformes*) включает в себя два семейства: осетровые (*Asipensiredae*), которые подразделяются на четыре рода (*Acipenser*,

Huso, Pseudoscaphirhynchus и Scaphirhynchus) с 26 видами и веслоносы (Polyodontidae), включающие в себя только два монотипических рода.

Традиционно к подсемейству осетровых Acipenserinae относили два рода - род осетр (Acipenser) и род белуга (Huso), в который включают два самых крупных вида осетровых – белугу (*H. huso*) и калугу (*H. dauricus*). Последние данные показывают, что объединение белуги и калуги в отдельный род неправомерно, и все чаще их рассматривают как виды в роде осетры (Vasileva, 2009). Род Acipenser – самый многочисленный среди всех осетровых. На основании современных молекулярно-филогенетических данных в нем выделяют три эволюционные ветви (рис.1.1.).

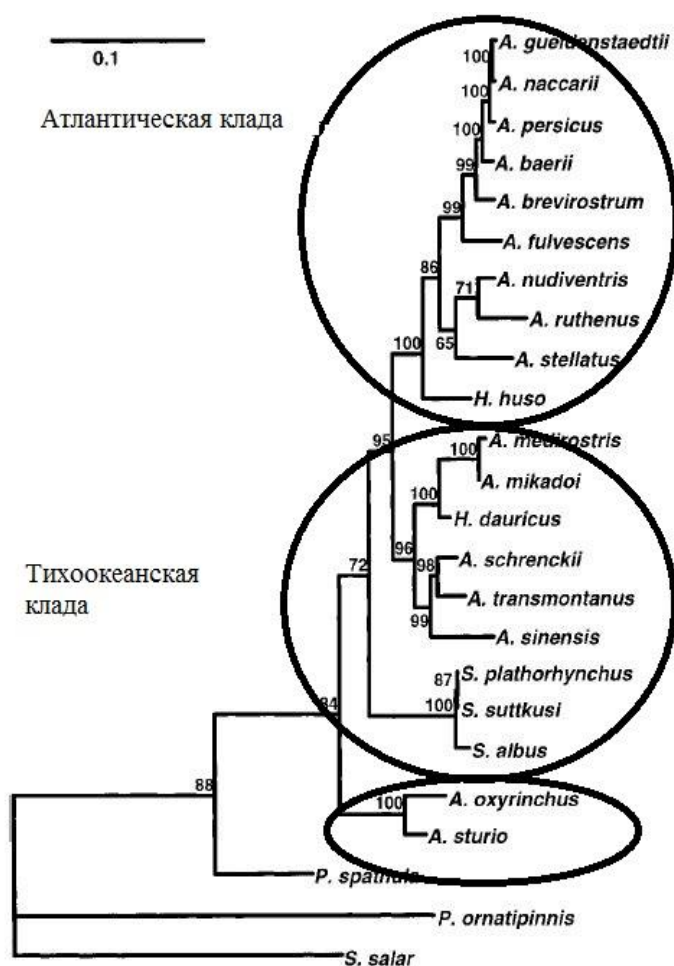


Рисунок 1.1. Филогенетическое дерево осетровых по гену CO1 (Ludwig, 2001).

Самую примитивную ветвь составляют европейский (*A. sturio*) и атлантический (*A. oxyrhynchus*) осетры. Далее филогенетическое дерево осетров делится на две ветви. Первая – это группа осетров бассейна Атлантического океана. К ней относятся азово-черноморско-каспийские осетры - русский (*A. gueldenstaedtii*), персидский (*A. persicus*), стерлядь (*A. ruthenus*), шип (*A. nudiventris*) и севрюга (*A. stellatus*), а также близкие родственники русского осетра – адриатический (*A. naccarii*) и сибирский (*A. baerii*) осетры. Ранее адриатический осетр обитал в бассейне Средиземного моря, но сейчас почти исчез в естественной среде обитания. К этой ветви относится и белуга (*H. huso*). Кроме того, к этой ветви осетров относятся виды, обитающие в реках и озерах на восточном побережье Северной Америки, такие как озерный (*A. fulvescens*) и тупорылый (*A. brevirostrum*) осетры.

Другая ветвь родословного дерева осетров включает виды, нерестящиеся в реках, впадающих в Тихий океан. С азиатской стороны это амурский (*A. schrencki*), китайский (*A. sinensis*), корейский (*A. dabryanus*) и сахалинский (*A. mikadoi*) осетры, а также калуга (*H. dauricus*). В реки американского побережья поднимаются на нерест зеленый (*A. medirostris*) и белый (*A. transmontanus*) осетры (Vemis, Kenard, 1997; Артюхин, 2008).

Большинство осетровых являются проходными и полупроходными рыбами, которые совершают нерестовые миграции из морских и прибрежных вод вверх по течению рек (анадромные миграции), в которых происходит нерест, развитие и рост молоди от рождения до нескольких лет (Берг, 1911; Макаров и др., 2000; Ruban et al., 2001; Khodorevskaya et al., 2009; Павлов, Скоробогатов, 2014). Нагул, основной рост и созревание осетровых, напротив, происходит в море, где кормовая обеспеченность гораздо выше и соответствует пищевым потребностям и потенциальному росту этих относительно крупных рыб с большой массой тела (Васнецов, 1947).

Исключение составляют пресноводные (потамодромные) виды осетровых - стерлядь, лопатоносы, озерный и сибирский осетр и ряд других видов, приспособленных к пресноводному образу жизни.

Осетровые являются ценными в хозяйственном отношении рыбами, а черная икра, получаемая от осетровых, одним из самых полезных продуктов животного происхождения (Ludwig, 2008; Fain et al., 2013; Jahrl, 2013). Осетровая икра всегда была не только дорогим деликатесом, но и знаменитым российским брендом. "Икра русского осетра, возможно, больше дала для международных отношений, чем все русские сановники вместе взятые за всю историю. Эта простая, на первый взгляд, еда стоит в одном ряду с такими общемировыми ценностями, как жемчуга, соболя, старое серебро и кубки Челлини" (Сэффрон, 2006).

Чем меньше становится осетров, тем дороже стоит икра, и в настоящее время все осетровые, в том числе и в Сибири, находятся на грани исчезновения в связи с потерей привычной среды обитания и естественных нерестилищ, а главное, чрезмерной эксплуатацией и варварским браконьерством. (Гершанович, 1993; Гусейнов, 1996; Рубан, 1999; Ходоревская, 2002; Ходоревская, Романов, 2006; Krieger et al., 2008; Ludwig, 2008; Khodorevskaya et al., 2009; Калмыков, Рубан, Павлов, 2009; Рубан и др., 2015). 25 видов осетрообразных видов классифицируются как находящиеся под угрозой исчезновения (IUCN Red list, www.iucnredlist.org), при этом большинство популяций продолжает уменьшаться, а вымирание некоторых видов является весьма вероятным (Rosenthal et al., 2014). В результате к настоящему моменту уже практически полностью уничтожен европейский осетр, внесены в Красную книгу Российской Федерации азовская белуга, сахалинский осетр, байкальская и обь-иртышская популяции сибирского осетра, и ситуация продолжает ухудшаться (Красная книга..., 2001). В природном ареале исчез шип Аральского моря, вымершим считается лжелопатонос из р. Сырдарья (*Pseudoscaphirhynchus fedtschenkoi*) и редко встречаются амударьинский малый (*Ps. hermanni*) и большой (*Ps. kaufmanni*) лжелопатоносы (Сальников и др., 2013), также занесенные в Красную книгу. В список исчезающих видов попал и шип Каспийского моря (Черняк, 2009).

В связи с этим с начала 2000-х годов в России промышленный лов осетровых приостановлен, а с 2005 года полностью прекращен. С 1997 года все осетровые включены в приложения 1 и 2 Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения - CITES (Raymakers, 2006; Ludwig, 2008), а также внесены в различные категории Международной Красной книги (IUCN) (International Union..., 2016) (Birstein et al., 1997, Raymakers and Hoover, 2002). В нашей стране за исключением спортивного рыболовства сибирского осетра в реке Лена и стерляди, для остальных видов осетровых вылов осуществляется только для целей воспроизводства и научных исследований.

1.2. Геномная организация осетровых

Осетровые рыбы представляют большой интерес для изучения генетических и эволюционных процессов. Статус "живых ископаемых" делает их важными для понимания и эволюции хрящевых ганоидов и позвоночных в целом.

Изучение организации генома осетровых рыб имеет ряд особенностей, связанных, прежде всего, с их полиплоидным происхождением, которое играет важную роль в эволюции и филогенетическом разнообразии рыб (Schultz, 1979). В процессе эволюции таксона полногеномная дупликация может происходить неоднократно и независимо в различных ветвях (Le Comber et al, 2004; Mable et al., 2011).

По данным некоторых авторов (Brown et al., 1996; Birstein, 1997) осетровые рыбы характеризуются сравнительно медленной молекулярной эволюцией, скорость накопления мутаций в их ядерных генах меньше, чем у костистых рыб Teleostei (Krieger et al., 2000; de la Herran et al., 2001; Krieger, Fuerst, 2002). Имеются данные о замедлении скорости кариологической (Lanfredi et al., 2001; Chicca et al., 2002) и биохимической эволюции (Khabarov et al., 2002).

Осетровые выделяются среди других рыб большой морфологической пластичностью и исключительно широко распространенной межвидовой гибридизацией даже между удаленными таксонами (Николюкин, 1972).

1.3. Об уровне ploидности генома осетровых

Роды *Acipenser* и *Huso* объединяют виды с различной степенью ploидности, кариологически различающихся по числу хромосом (Васильев, 1985; Бирштейн, 1987; Ludwig et al., 2001; Kim et al., 2005; Васильев, 2009) и подразделяются на несколько групп. Первая группа включает в себя виды с ~ 120 (между 110 и 130) хромосомами - белуга, стерлядь, севрюга, шип, атлантический и европейский осетры; вторая группа - виды с ~ 250 хромосомами, включает все таксоны с хромосомным набором, варьирующим между 220 и 276 хромосомами (русский осетр, сибирский осетр, адриатический осетр, сахалинский осетр (Вишнякова и др., 2008). Отдельно выделяется короткорылый осетр, имеющий около 360 хромосом (Fontana et al., 2008). Этот вид имеет не только наибольшее число хромосом, но и, соответственно, самое большое количество ДНК среди всех представителей *Acipenseriformes*. Наличие большого числа хромосом в ядре клетки и, в том числе, большого количества микрохромосом является одной из причин споров об уровне ploидности осетровых видов рыб.

Исследование окрашенных участков NORs у четырех различных видов осетровых, позволило заключить, что виды с ~ 120 хромосомами являются тетраплоидами, а виды с ~ 250 хромосом - октаплоидами (Бирштейн, Васильев, 1987). С другой стороны, Фонтана и коллеги, который изучал NOR на четырех других видах осетровых пришел к выводу, что группа со ~ 120 хромосомами является в полной мере диплоидизированной (Fontana, 1994). Поэтому группа видов с ~ 250 хромосомами должны рассматриваться как тетраплоиды, а *A. brevirostrum* - как гексаплоид. Эта классификация используется и в последние годы (Tagliavini et al., 1999; Fontana, 2002; Fontana et al., 2008).

Различный уровень пloidности видов *Acipenseriformes* подтверждают исследования аллозимов методом разделения белков путем электрофореза в крахмальном и полиакриламидном гелях (Кирпичников, 1987). Известно, что большинство ферментов в живом организме представлено несколькими формами – изоферментами или аллозимами – продуктами разных аллелей одного и того же гена (Алтухов, 2003). Так В.Я. Бирштейн с соавторами (Birstein et al, 1997) показали дублирование белковых локусов у видов со ~ 120 хромосомами, что подтверждает их эволюционно тетраплоидное происхождение. Биохимическое исследование альбуминов сыворотки крови 11 видов отряда *Acipenseriformes*, проведенное Е.В. Кузьминым (Кузьмин, 1996), позволило ему по степени гетерогенности альбуминовой фракции разделить *Acipenseridae* на 2 группы, совпадающие с мало- и многохромосомными видами осетровых. К первой группе отнесли стерлядь, шип, белугу, калугу, севрюгу, амударьинского лопатноса, веслоноса и сахалинского осетра, хотя предшествующие результаты, полученные на основании данных по количеству ДНК в ядре эритроцита, предполагали у сахалинского осетра 16-плоидный геном. (Birstein et al., 1993), а ко второй - русского, сибирского и амурского осетров. Денситометрический анализ альбуминов представителей обеих групп позволил заключить, что виды первой из них являются диплоидами, а второй - тетраплоидами. В дальнейшем выяснилось, что калуга и сахалинский осетр являются тетраплоидами (Вишнякова и др., 2008; Васильев и др., 2009) и должны были бы относиться ко второй группе. Это указывает на низкий уровень достоверности данных, получаемых денситометрией аллозимных фореграмм.

В результате накопившихся данных было выдвинуто несколько гипотез о механизмах полиплоидизации осетровых. Одна из них предполагает автополиплоидию общего 60-хромосомного предка и дальнейшую вторичную дубликацию генома у различных дивергентно разошедшихся видов (Birstein et al., 1997; Fontana et al., 2007). Это могло произойти около 150-200 млн лет назад, поскольку видов семейства *Acipenseridae* с 60 хромосомами к

настоящему времени не существует. Людвиг и соавторы (Ludwig et al., 2001) предположили четыре события полиплоидизации в эволюции осетровых видов рыб. Васильев с соавторами (Vasil'ev, 2009; Vasil'ev et al., 2010) предположили, что полиплоидизация аллоплоидного типа происходила минимум три раза с периодической межвидовой гибридизацией.

1.4. Полиморфизм митохондриальной ДНК

Наряду с биохимическими и кариологическими методами, с конца 90-х годов прошлого века начинают активно исследовать последовательности различных участков митохондриальной ДНК для видовой, популяционной и даже индивидуальной идентификации, а также для построения филогенетических деревьев и межгаплотипных сетей на основе изменчивости митохондриальных последовательностей. Современные методы анализа ДНК по сравнению с доминирующими ранее биохимическими методами, безусловно, гарантируют получение гораздо более детальной картины генетической изменчивости. Для анализа обычно используются некодирующий контрольный регион мтДНК (Д-петля), способный накапливать мутации, так как в гораздо меньшей степени подвержен селективным ограничениям и показывает уровень полиморфизма, многократно превосходящий полиморфизм белков (Алтухов, Салменкова, 2002) а также гены цитохрома В (CytB), цитохром оксидазы I (CO1) и рибосомальные гены 12S и 16S.

В одной из первых работ по построению филогении осетровых, основанной на секвенировании участков цитохрома В и последовательностей двух субъединиц митохондриальной рибосомы (12S и 16S) (Birstein, DeSalle, 1998), авторы укореняли деревья к аутгруппе, в которую входят веслонос (*Polyodon spathula*) и псефурус (*Psephurus gladius*), видам, которые очень давно отделились от собственно осетровых. По этим первым результатам получено больше вопросов, чем ответов. Например, белуга по одному дереву образует родственную кладу вместе с калугой, а по другому дереву с русским осетром.

При этом сибирский осетр по филогенетическому дереву, построенному по последовательностям генов РНК ложится очень далеко от своего ближайшего родственника, как мы знаем на сегодняшний день, русского осетра (Birstein, DeSalle, 1998).

В следующей работе этих же авторов, сделанной по пяти различным маркерам, понто-каспийская клада осетров (адриатический, русский, сибирский и персидский) относится уже к одному близкородственному кластеру (Birstein et al., 2002). Ими показано, что *Scaphirhynchus* и *Pseudoscaphirhynchus* не являются сестринскими и подсемейство лопатоносы, в которое объединяли эти два рода, не является монофилетичным. Морфологическую схожесть между лопатоносами и лжелопатоносами можно объяснить конвергентной эволюцией в похожих условиях обитания в речных системах Северной Америки и Центральной Азии. Лжелопатоносы показали наибольшую родственную связь с севрюгой (*A. stellatus*).

Практически такой же результат получен позже, когда был сделан акцент на положение *Scaphirhynchus* в семействе (Dillman et al., 2007). В этой работе подтверждается неродственность *Scaphirhynchus* и *Pseudoscaphirhynchus*. Также в этой работе получены данные по особям сибирского осетра, принадлежащим трем популяциям. Все популяции сибирского осетра легли в близкородственный видовой кластер, который входит в группу видов русского осетра (русский, адриатический и персидский осетры). И, как и в других работах, семейство веслоносов (полиодон и псефур) образует отдельную группу по отношению к семейству Asipensireidae. Это дерево в целом уже отражает современный взгляд на филогению осетровых. В этом же году Пенг с соавторами (Peng et al., 2007) впервые публикует филогенетическое дерево осетровых с датировками, основанными на ископаемых находках (рис. 1.2.).

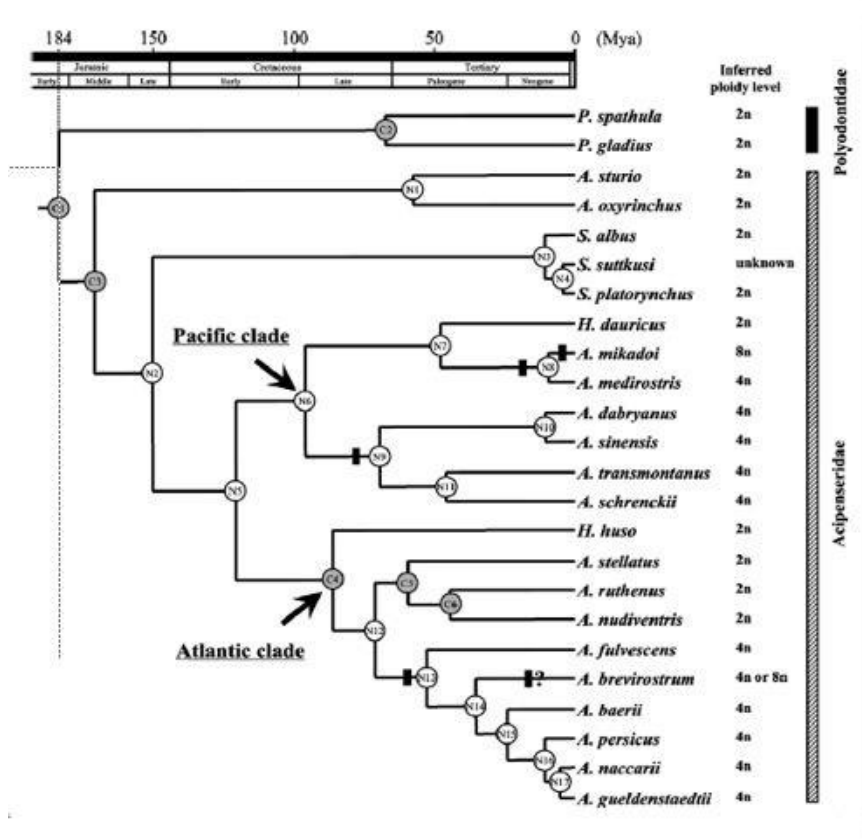


Рисунок 1.2. Филогенетическое дерево осетровых (Peng et al., 2007). Штрихами на схеме указаны события полиплоидизации генома.

Шкала показывает, что единый предок, от которого произошли все ныне живущие осетровые, существовал приблизительно 184 млн. лет назад, когда разделились собственно осетровые и веслоносы. Приблизительно 120 млн. лет назад разошлись Тихоокеанская и Атлантическая (понто-каспийская) клады осетровых видов, каждая из которых независимо дала ветвления на много и малохромосомные виды. На схеме указаны события полиплоидии в семействе. Правда, в 2007 году калугу еще считали малохромосомным, а сахалинского осетра - октаплоидным (эволюционно 16-плоидным) видами, поэтому у тихоокеанской клады датировка этого события указана не совсем верно, удвоение генома произошло около 100-110 млн. лет назад.

Что касается сибирского осетра, то произошедшая миграция между каспийским и арктическим бассейнами привела к вселению из каспийского моря предков сибирского осетра в реки арктического бассейна. По данным молекулярной хронологии (Peng et al., 2007), это произошло приблизительно 24

млн. лет тому назад, и с тех пор сибирский осетр сформировался как вид, четко отличающийся от русского осетра как по морфологическим признакам, так и по митохондриальной ДНК.

Однако для самого русского осетра известны две неродственные группы гаплотипов: один кластер, построенный на основании последовательности гена *CytB* совпадает с митотипами персидского и адриатического осетров, в то время как мтДНК другой группы особей по этому гену чрезвычайно сходна с последовательностью мтДНК сибирского осетра *A. baerii*, вследствие чего данный митотип назван «*baerii-like*» гаплотип. Присутствие в составе русского осетра гаплотипов близких к сибирскому осетру впервые были отмечены в работе Дженнекенса (Jennekens et al., 2000), а затем подтверждены в работе Бирштейна и соавторов (Birstein et al., 2000). Согласно гипотезе, развиваемой в работах Бирштейна и соавторов (Birstein et al., 2000; Birstein et al., 2002; Birstein, Ruban, 2004; Birstein, 2005; Birstein et al., 2005), сибиреподобный гаплотип в Каспийском море рассматривается как крайняя форма естественного полиморфизма русского осетра. Согласно этой гипотезе, расселение русского осетра по системе рек в бассейны сибирских рек сопровождалось случайным подхватыванием мигрантами только этого митохондриального гаплотипа из всего разнообразия митохондриальных гаплотипов популяции Каспийского моря. В дальнейшем из потомков русского осетра, попавших в бассейны рек Сибири сформировалась форма, морфологически идентифицируемая как *A. baerii*, а эффекты бутылочного горлышка и колебания численности популяций привели к фиксации сибирского гаплотипа во всех популяциях этого вида. Однако наши данные позволяют рассмотреть другую версию происхождения «*baerii-like*» гаплотипа, которая нам представляется более вероятной и будет рассмотрена в настоящей работе.

1.5. Полиморфизм микросателлитных локусов

Для изучения генетического полиморфизма видов, уровня пloidности и механизмов наследования, наравне с митохондриальными маркерами, широко используются ядерные маркеры, в частности, микросателлитные локусы (STR), изучение их аллельного состава. Именно эти регионы ДНК, не находящиеся под давлением отбора, эволюционируя с более высокой по сравнению с ядерными белок-кодирующими генами скоростью, постепенно накапливают наследуемые в потомстве дифференциальные признаки. Микросателлитные локусы обладают менделевским кодоминантным наследованием (Beaumont, Hoare, 2003; Weising et al., 2005). Их локус-специфичный анализ позволяет проводить межвидовую, внутривидовую (популяционную) и индивидуальную идентификацию особей (Никитина, Назаренко, 2004; Ellegren, 2004; Тимошкина и др., 2010). STR-локусы широко распределены по всему геному. У рыб микросателлитные локусы встречаются приблизительно каждые 10000 пн (Wright, 1993).

Особенностью мутационного процесса в микросателлитах является изменение длины последовательности, как правило, на целый повторяющийся элемент (2-6 пар нуклеотидов) и эти изменения протекают с достаточно высокой скоростью (Ellegren, 2004).

Одним из ограничений этого метода является возможность использовать одни и те же локусы только для близких видов (Алтухов, Салменкова, 2002; Ellegren, 2004). Однако низкая скорость молекулярной эволюции ядерной ДНК позволяет использовать одни и те же локусы на широком круге видов осетровых (May et al., 1997; Zane et al., 2002). Практически все праймеры, разработанные на одном из видов осетровых, амплифицируются на всех других видах с различиями в диапазоне и степени полиморфности данного локуса. Двадцать пар праймеров, сделанных для русского осетра и других видов были амплифицированы на 10 различных видах осетровых (Raikov et al., 2014).

Тетрасомное, редуцированное (дуплицированное дисомное), и октасомное наследование описано для различных видов осетровых во многих работах. Исследуя плоидность *Acipenseriformes* Людвиг с соавторами (Ludwig et al., 2001) на примере шести микросателлитных локусов показал, что все виды со ~120 хромосомами – функциональные диплоиды, а с ~240 хромосомами – функциональные тетраплоиды. Пятковит с коллегами (Pyatskowit et al., 2001) исследовал микросателлиты озерного осетра и на основе полученных данных сделал вывод о тетрасомном наследовании локусов у этого вида, хотя он также обнаружил локусы, которые давали не более двух аллелей. Другие исследователи на шести малохромосомных видах осетровых (севрюга, белуга, стерлядь, шип, атлантический и европейский осетры) показали дисомное наследование локусов, а на четырех многохромосомных видах (русский, персидский, сибирский и адриатический осетры) - тетрасомное (Jenneckens et al., 2001). Фоп-Баят (Fopp-Bayat, 2008), анализируя гаплоидное потомство сибирского осетра, обнаружила и ди и тетра и октаплоидное наследование. Хавелка и соавторы (Havelka et al., 2013) на примере анализа 11 микросателлитных локусов показали не только «традиционное» дисомное наследование для видов со 120 хромосомами и тетрасомное для видов с 250 хромосомами, но и обнаружили для четырех исследованных локусов тетрасомное наследование для первых и октасомное – для вторых. Однако, некоторые авторы указывают на полную диплоидизацию генома самцов многохромосомного белого осетра (*A. transmontanus*) (Van Eenennaam et al., 1998). Эти данные опровергаются другими исследователями, и, более того, показано, что белый осетр имеет плоидность более $4n$ (Rodzen, May, 2002) и даже $8n$ и более (Schreier, May, 2011).

Чешские исследователи (Havelka et al., 2014) опубликовали данные о выявлении особей аквакультурного сибирского осетра с аномальной для этого вида плоидностью $6n$ – гексаплоидов и исследовали его потенциальную стерильность или фертильность. Оказалось, что после стимуляции гормонами, спонтанный гексаплоидный самец сибирского осетра продуцировал

нормальную сперму способную к оплодотворению, и оплодотворенная этой спермой икра обычных тетраплоидных самок русского и сибирского осетров продуцировала жизнеспособное, не уродливое пентаплоидное ($5n$) потомство с промежуточным уровнем ploидности родителей. Авторы сделали вывод, что увеличение числа хромосом в 1,5 раза у диплоидов приводит к получению триплоидов, которые обладают нечетным количеством хромосом, вызывающее их бесплодие или субфертильность из-за нарушений гаметогенеза. Напротив, у тетраплоидов прирост числа хромосом в 1,5 раза приводит к четному количеству хромосом, и, следовательно, к фертильности изучаемого гексаплоидного образца.

Необходимость статистического анализа получаемых данных вынуждает исследователей искать STR-локусы, которые имеют дисомный характер наследования (Ludwig et al., 2001; Pyatskowitz et al., 2001; McQuown et al., 2002), так как подавляющее большинство компьютерных программ (Mega, Genepop, Servus, GenAlEx6 (Peakall, Smouse, 2006), настройка Microsatellite Toolkit (Park, 2001), Microsatellite analyzer (MSA), Arlequin (Excoffier, Lischer, 2010) рассчитаны на данные, полученные при диплоидном наследовании.

Разработанные для озерного осетра *A. fulvescens* микросателлитные локусы показали как тетрасомное, так и дисомное наследование у озерного и зеленого осетра *A. medirostris* (Welsh, 2003). У этого автора для озерного осетра 24 из 128 микросателлитных локусов определены как потенциальные дисомные локусы. В работе 2006 года этого же исследователя 9 из этих локусов были проверены на дисомное наследование и стандартизированы для использования как тест-системы на озерного осетра в других лабораториях (Welsh, 2006). Недостатком этих работ является очень малое количество особей, используемых для анализа – в работе 2003 года - от 2 до 12 особей озерного и четыре зеленого, в работе 2006 – потомства одной самки и трех самцов.

В работе (Zane et al., 2002) 3 локуса из 7, разработанные для адриатического осетра (*A. naccarii*) показали на этом виде дисомное наследование. Однако, в работе 2011 года на этом же виде осетровых один из

этих локусов (An1) уже описан как тетрасомный (Congiu, 2011), из других 24 проанализированных в этой работе локусов - два описаны как дисомные - они же показывают дисомный характер наследования и у озерного осетра в вышеперечисленных работах.

В работе Райкова с соавторами (Rajkov et al., 2014) для тетраплоидных видов показано, что из 20 микросателлитных локусов ни один не показал полную диплоидизацию у адриатического и амурского осетров, а у русского и сибирского найдено всего по одному дисомному локусу. И наоборот, для диплоидных видов, таких как севрюга, белуга, стерлядь, были найдены локусы (11-15%) с тетрасомным наследованием. Хавелка с соавторами (Havelka et al., 2013) обнаружил несколько тетрасомных локусов для этих же диплоидных видов. Очевидно, что современные полиплоидные виды *Acipenseriformes*, находятся на разных уровнях диплоидизации генома.

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

1.6. Генетическая идентификация гибридов осетровых

Осетровые выделяются среди других рыб по исключительно широко распространенной скрещиваемости различных видов и большой морфологической пластичности (Николюкин, 1972; Birstein, 2006; Ludwig et al., 2009; Dudu et al., 2011), что затрудняет, а во многих случаях исключает идентификацию по принятым в ихтиологии морфологическим критериям. Также невозможно идентифицировать продукцию из осетровых без

применения молекулярно-генетических методов анализа ядерной и митохондриальной ДНК.

Наследование мтДНК по материнской линии ограничивает применение этого метода для особей гибридного происхождения. Необходимость определения точного видового происхождения образцов, поступающих на генетическую экспертизу для определения видовой принадлежности, а также бесконтрольная гибридизация в бурно развивающихся аквакультурных хозяйствах для получения товарной рыбы и пищевой икры, а иногда и для целей искусственного воспроизводства в связи с недостатком необходимых производителей, подтверждает необходимость выявления видоспецифичных ядерных маркеров. В целях контроля перемещения продукции из осетровых через границу, проводимого в рамках CITES, необходима возможность видовой ДНК-идентификации не только для всех существующих в России осетровых видов рыб, а также видов, поступающих к нам из Китая, Европы и Америки, таких как белый, озерный, китайский, адриатический и другие осетры.

В настоящее время не существует одного полностью достоверного метода ДНК-идентификации гибридов осетровых видов рыб, хотя значительная часть аквакультурной икры производится из осетровыми гибридами. Например, в Китае 38% получаемой продукции имеет гибридное происхождение (Wei et al., 2011). Гибридное производство икры обычно включает виды с одинаковым уровнем ploидности, и, хотя гибридизация между видами с различной степенью ploидности возможна, полученные гибриды либо стерильные, либо демонстрируют снижение качества и количества продуцируемой икры (Birstein, 2002).

В России в аквакультуре широкое распространение получили две формы гибридов: бестер (белуга x стерлядь) – гибрид между двумя диплоидами и «ролик» (русский осетр x сибирский осетр) – гибрид между тетраплоидными видами. Также используются в товарном производстве и другие гибридные комбинации. Например, в Европе очень любят культивировать гибрид между адриатическим и сибирским осетрами, а на Дальнем Востоке и в Китае

используют в производстве продукции двунаправленный гибрид между калугой и амурским осетром. В последние годы в международной торговле впервые появились такие гибриды, как *A. schrenckii* x *A. baerii* и *A. gueldenstaedtii* x *A. naccarii* (GUNA) (Boscari, 2013). Использование для искусственного воспроизводства и формирования РМС в аквакультуре диких и доместцированных производителей допускает возможность встречи практически с любой гибридной формой осетровых, описанных Л.С. Бергом еще в 1911 году (Берг, 1911; Берг, 1948; Birstein et al., 1997).

В одной из работ по видовой идентификации с использованием микросателлитных локусов было показано, что аллель 111 (пн) в локусе *LS-39* присутствует только у севрюги и отсутствует у 10 других видов осетровых (Jennekens et al, 2001), и использование этого локуса возможно при идентификации севрюги. К сожалению, применение локуса *LS-39* ограничено, поскольку этот локус не амплифицируется (или имеет нуль-аллель) у таких коммерчески используемых видов как русский и сибирский осетры. В другой работе (Fopp-Bayat, Luczynski, 2006) представлена попытка идентификации стерляди, белуги, русского и сибирского осетров, а также гибридов аквакультурного происхождения путем анализа диагностических аллелей по 5 микросателлитным локусам, однако ограниченность выборки (от 7 экземпляров) и низкие частоты аллелей, рассматриваемых авторами как «диагностические» (от 1%), а также несоответствие аллельного состава гибридов родительским видам по ряду локусов не позволяют использовать эти данные для корректной идентификации.

Румынские исследователи (Georgescu et al., 2013) провели анализ генетической вариабельности гибридов русского и сибирского осетра, содержащихся на аквакультурных хозяйствах страны по четырем микросателлитным локусам. Результаты этой работы будут применяться для проверки чистоты маточных стад сибирского и русского осетра и для повышения эффективности селекционных работ.

Исключение гибридов из селекционного процесса имеет важное значение, поскольку гибридизация считается наиболее быстродействующей генетической угрозой для находящихся под угрозой исчезновения популяций (Wolf et al., 2001).

Последние опубликованные работы по идентификации гибридов посвящены кроссам, в состав которых входит белуга – один из самых ценных и малочисленных видов осетровых. В работах (Boscari et al., 2013; Havelka et al., 2017) разработаны видоспецифичные праймеры на основе секвенирования ddRAD и для идентификации родительских видов, а также бестера и других гибридов, в состав которых входит белуга.

Исследование больших выборок осетровых позволило выявить диагностически информативные аллели и предложить метод диагностики гибридных форм осетровых (Барминцева, Мюге 2013), представленный в главе 3.2 данной работы

1.7. Популяционно-генетическая структура осетровых

В конце 60-х годов прошлого века появилось новое направление в популяционных исследованиях рыб – биохимическая (аллозимная) генетика популяций, которая открыла новые возможности изучения внутривидовой генетической изменчивости (Алтухов, Салменкова, 2002).

Так, для дифференциации различных стад и популяций с помощью электрофореза некоторых белков крови (альбуминов, гемоглобина, трансферринов), были изучены многие виды осетровых рыб (Лукьяненко и др., 1977; Цветненко, 1984; Субботкин, 1987). Цветненко (Цветненко, 1993), исследуя популяции севрюги из Азовского и Каспийского моря показала различия между ними по частотам фенотипов трансферринов и альбумина. Частоту встречаемости альбуминов использовали для сравнительных исследований популяций русского осетра и белуги (Иваненков и Камшилин, 1991). Высокий полиморфизм белков сыворотки крови севрюги из Северного

Каспия были показаны в работе и других авторов (Лукьяненко и др., 1977; Рябова и др., 1995). Эти результаты согласовались с исследованиями севрюги из Южного Каспия (Pourkazemi, 1996). Различные частоты аллелей наблюдали как между самцами и самками, так и между озимыми и яровыми расами русского осетра (Чихачев, 1983). Однако белки крови не были надежными маркерами для дифференциации популяций, так как их изменчивость зависит в значительной степени от функционального статуса организма (Лукьяненко и др., 1977).

Популяционная структура стерляди из рек Дон и Кама, а также сибирского осетра из реки Обь была исследована с использованием изоферментов малатдегидрогеназы (MDH) (Кузьмин, 1991). Одним из результатов работы стал вывод о невозможности дифференцировать эти два вида в связи с низким уровнем полиморфизма данного белкового локуса и высокой гомологией изученных видов по аллелям MDH. Хотя в ранних работах Кузьмина с соавторами выявлен внутривидовой полиморфизм енисейской, обской и байкальской популяций сибирского осетра по сывороточным альбуминам (Кузьмин, 1982, 1984).

По сравнению с доминировавшими ранее методами анализа белкового полиморфизма, ДНК-анализ обеспечивает получение гораздо более полной картины генетической изменчивости. Во многих случаях переменные генетические маркеры позволяют обнаружить межвидовые или межпопуляционные генетические различия, не распознаваемые методами электрофореза белков (Mamuris et al., 1999; Smith, McVeagh, 2000).

Микросателлитные локусы, локализованные в основном в некодирующих областях генома, считаются нейтральными маркерами; для них характерна большая частота мутаций и их все чаще используют для исследования генетической дифференциации близких популяций.

Исследование нескольких десятков особей адриатического осетра - остатка популяции этого исчезающего вида, проведенные с помощью микросателлитных и митохондриальных маркеров (Zane et al., 2002), показали

его дифференцирование согласно географическому происхождению особей этого вида. Более того, микросателлитные маркеры позволили найти значимые отличия адриатического от русского осетра, тогда как по митохондриальной ДНК несколько особей этих же видов имели схожие гаплотипы. В этом исследовании были использованы локусы, разработанные как для адриатического, так и для озерного осетров.

В исследовании популяционной структуры белого осетра в Северной Америке на основании анализа STR-маркеров, разработанных для белого осетра и атлантического осетра, было показано изменение популяционной структуры этой единой некогда популяции *A. transmontanus* на участках реки Фрезер, разделенных плотинами (Smith et al., 2002).

В работе Макквона с соавторами (McQuown et al., 2003) изучена популяционная структура озерного осетра – вида, который в середине 20 века почти исчез из многих районов Северной Америки и для которого была разработана приоритетная программа восстановления в его естественном ареале. Для этого подробно был изучен уровень его популяционно-генетической дифференциации. Семь выборок из разных рек были проанализированы по семи микросателлитным локусам и статистический анализ генетических дистанций по Нею (Nei, 1973) выявил три различные популяционные группы, которые также были близки и по географическому критерию.

В работе Эми Вельш с коллегами (Welsh et al., 2008) были исследованы особи, собранные с 27 нерестилищ озерного осетра в бассейне Великих озер и Гудзонова залива с использованием 12 микросателлитных локусов для понимания естественной популяционной структуры вида для определения, какие популяции могут выступать донорскими для повторного заселения бывшего ареала этого вида.

В другой работе по изучению популяционной дивергенции озерного осетра в реке Оттава были проанализированы 10 выборок из различных участков реки протяженностью более 500 км по 14 микросателлитным локусам

и в результате было установлено, что популяция озерного осетра на протяжении всей реки находится в панмиксном состоянии (Wozney et al., 2011).

1.8. Сибирский осетр - биология, видовая структура и другое.

Объект настоящего исследования, сибирский осетр *A. baerii* Brandt, 1869 является потамодромным видом, широко распространенным во всех крупных реках Сибири от Оби до Колымы, а также в оз. Байкал (рис. 1.3.) (Берг, 1948; The Siberian sturgeon..., 2018).



Рисунок 1.3. Ареал сибирского осетра, его основные выделяемые популяции (Обь-иртышская, Енисейская, Ленская, рек Индигирка и Колыма, оз. Байкал) и предлагаемое разделение на подвиды (Богущая, Насека, 2004).

Несмотря на суровые условия обитания данного вида, к настоящему времени его морфологические и эколого-биологические характеристики изучены достаточно полно. Г.И. Рубан в своей монографии о экологии и видовой структуре сибирского осетра (Рубан, 1999), помимо собственных результатов, привел широкий библиографический обзор истории изучения этого вида, начиная с далекого 1775 г., когда И.Г. Георги отнес сибирского

осетра из оз. Байкал и впадающих в него рек к виду *Asipenser sturio* (Georgi, 1775).

После описания Брандтом в 1869 году сибирского осетра из рек Обь и Лена (Brandt, 1869), многие исследователи, вели долгую дискуссию о систематическом положении этого осетра из различных водоемов Сибири и его названии. Через 7 лет Г.В. Никольским был описан как отдельный вид сибирский осетр из реки Енисей - узкорылый осетр *A. stenorhynchus* и байкальская форма узкорылого осетра *A. stenorhynchus* var. *baikalensis* (Никольский, 1902). В последующие годы и до середины 90-х годов проводились многочисленные ревизии, в результате было принято деление сибирского осетра на три подвида – *A. b. baerii* (Обь-Иртышский бассейн), *A. b. stenorhynchus* (реки Енисей, Лена, и реки к востоку от Лены до р. Колымы и Индигирка) и *A. b. baikalensis* (оз. Байкал и впадающие в него реки Селенга и верхняя Ангара) (Sokolov, Vasilev, 1989; Рубан, Панайотиди, 1994; Рубан, 1997). Подвиды были выделены на основании различий морфологических и меристических признаков особей сибирского осетра из различных районов его ареала. Дальнейшее изучение сибирского осетра показало значительную внутривидовую морфологическую изменчивость. Г.И. Рубан писал, что "в пределах ленского бассейна по пластическим признакам выделяются феноны, уровень различий между которыми выше, чем между географически изолированными популяциями ранее выделяемых подвигов". Кластерный анализ по пластическим и меристическим признакам также свидетельствует о монотипичности этого вида (Рубан, 1998; Рубан, 1999). Это послужило основанием распространенного мнения о необоснованности выделения подвигов. В настоящее время современная систематика рассматривает названия подвигов как младшие синонимы видового названия сибирского осетра *A. baerii* (Froese, R. and D. Pauly, 2017, Fishbase; Eschmeyer et al. Catalog of fishes...).

В работе В. Бирштейна с соавторами (Birstein et al., 2009) исследовался полиморфизм митохондриальной ДНК по двум маркерам – участку контрольного региона (Д-петля) и «баркодинговому участку» гена цитохрома

оксидазы I (COI) сибирского осетра. Этот маркер последнее время широко используют для видовой диагностики - ДНК-штрихкодирования (Folmer et al, 1994; Hebert et al., 2003). Ген COI проиллюстрировал отсутствие вариации в пределах вида, тогда как контрольный регион отображал статистически значимые различия молекулярной дисперсии между исследуемыми тремя подвидами сибирского осетра (AMOVA).

1.9. Современное состояние и введение сибирского осетра в аквакультуру

Катастрофическое снижение запасов российских осетровых в последние три десятилетия, вызванное нерациональным и нелегальным промыслом, зарегулированием рек, исчезновением привычных нерестилищ и загрязнением водоемов, не обошло стороной и популяцию сибирского осетра, который еще в 30-х годах XX века, обеспечивал ежегодные уловы в несколько тысяч тонн (Рубан, 1999; Нефедов, 2008), из них около 70 процентов давал бассейн Оби, около 22 – бассейн Енисея и остальные Восточная Сибирь (Дрягин, 1947), но сегодня в связи с малой численностью, имеет незначительное промысловое значение.

В настоящее время вид включен в перечень особо ценных диких животных и водных биологических ресурсов, утвержденный Постановлением Правительства Российской Федерации № 978 от 31.10.2013, а байкальская и обская популяции сибирского осетра занесены в Красную книгу Российской Федерации (Красная Книга..., 2001).

Сибирский осетр также занесен в Приложение II СИТЕС, включен в Красный список МСОП со статусом ENA2d (вид в угрожаемом состоянии с резко сокращающейся численностью в результате эксплуатации) (International Union..., 2016).

Одним из способов сохранения этого ценнейшего вида осетровых рыб, наряду с искусственным воспроизводством естественных популяций является

искусственное выращивание этих рыб в неволе для получения товарной продукции, что стало возможным благодаря разработке учеными-практиками биологических основ этого сложного и многоступенчатого процесса (Строганов, 1968; Детлаф и др., 1981; Бурцев и др., 1984; Бурцев и др., 1999). Предвидя возможность полного подрыва запасов осетровых из-за влияния антропогенных факторов, Строганов писал "... Возможно, что прудовое рыбоводство единственный гарантированный от катастрофы путь сохранения осетровых" (Строганов, 1968, стр. 10) и "осетровые заводы в будущем могут стать основными поставщиками осетрины и черной икры и обеспечивать широкую материальную базу для селекционных ...работ" (Строганов, 1968, стр. 366).

Сибирский осетр является первым из осетровых, введенным в массовую товарную аквакультуру и по настоящее время остается важнейшим видом, выращиваемым в искусственных условиях как в России, так и других странах (Bronzi et al., 2011; Bronzi et al., 2014).

Введение в аквакультуру началось в 1973 году, когда впервые 61 тыс. оплодотворенных икринок были получены от диких производителей на реке Лена и перевезены в Конаково - экспериментальное тепловодное рыбоводное хозяйство в Тверской области недалеко от Москвы. Поставки оплодотворенной икры в Конаково продолжались и в последующие годы (Малютин, Рубан, 2009). В Конаково на этом виде были разработаны методы содержания, кормления, получения икры и выращивания посадочного материала и товарной продукции в полностью искусственных условиях (Смолянов, 1987).

Наибольшую популярность на европейской части России приобрело разведение сибирского осетра благодаря его высокой экологической пластичности и огромной потенциальной способности к росту и ускорению созревания при попадании в благоприятные условия тепловодных осетровых хозяйств. До конца прошлого века сибирский осетр в аквакультуре был представлен почти исключительно ленской популяцией, ведущей свое происхождение от маточного стада Конаковского ОРЗ.

В 1980 году часть осетров (300 личинок) была отправлена во Францию, где также начала успешно развиваться аквакультура сибирского (ленского) осетра (Williot et al., 2001). Подавляющее большинство аквакультурных стад сибирского осетра, существующих в настоящее время по всему миру, также произошли от потомков ограниченного числа особей осетра из р. Лена, разводимого на Конаковском ОРЗ.

Пытаясь избежать обеднения генофонда своего маточного стада, Конаковский ОРЗ в дальнейшем приобрел партии оплодотворенной икры, взятые из природной популяции р. Лена в 1988 и 1991 г. и добавил этот материал к существующим генерациям 1973-1976 гг. (Породы..., 2008).

В процессе селекционной работы, проводимой на Конаковском осетровом заводе, была выведена и зарегистрирована одомашненная форма ленского осетра (№ 9357522; дата внесения в госреестр 1993г.) (Реестр, 2016) и далее порода Лена 1 (№ 9463263; дата внесения в госреестр 2008г.) (Реестр, 2016).

При выведении породы селекция была направлена на повышение рабочей плодовитости самок, устойчивой толерантности молоди к технологическим воздействиям, хорошей реакции на гормональные инъекции.

Сроки наступления половой зрелости у одомашненных тепловодных производителей за 30 лет доместикации сократились до 6-7 лет, природные же самки в реке Лена созревают в 11-22 года.

Высокая экологическая пластичность этого вида позволила в условиях повышенных температур ускорить рост в 7-9 раз по сравнению с осетрами из р. Лена. В среднем 7-8 годовалые осетры из естественной среды обитания весят около 1 кг, на Конаковском ОРЗ этот показатель достигает 7-10 кг.

В настоящее время Конаковский завод является хозяйством-оригинатором и, совместно с ФГБНУ ВНИПРХ, единственным владельцем породы сибирского (ленского) осетра ЛЕНА-1.

В последнее время ряд аквакультурных хозяйств в западной Сибири начали выращивать в условиях аквакультуры осетра, чьи производители имеют

происхождение из реки Обь и ее притоков. В 1999 году стадо обско-иртышского сибирского осетра создали и на Конаково, используя посадочный материал из Абалакского ОРЗ (Нефедов, 2008).

Исследование природного генетического полиморфизма сибирского осетра имеет непосредственное значение как для разработки мер по охране и восстановлению природных популяций этого вида, так и для развития аквакультуры (Birstein et al., 1999). Если по митохондриальным маркерам на небольших выборках и проводились исследования полиморфизма естественных популяций этого вида (Мюге и др., 2008; Birstein et al., 2009), то по ядерным маркерам сибирский осетр исследовался в основном, как объект аквакультуры и для получения различных гибридных линий осетровых (Forr-Bayat, Luczynski, 2006; Georgescu et al., 2013; Rajkov et al., 2014; Havelka et al., 2014). Природный же полиморфизм сибирского осетра по генетическим маркерам изучен явно недостаточно.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Сбор образцов

Образцы для настоящей работы были собраны в период с 2002 по 2016 гг. Пробы отбирали прижизненным методом отрезания фрагмента спинного или грудного плавника, образцы фиксировались в 96% этиловом спирте на местах сбора материала. Все взятые образцы были занесены и хранятся в настоящее время в Российской Национальной Коллекции Эталонных Генетических Материалов (РНКЭГМ) ВНИРО (Свидетельство об официальной регистрации базы данных № 2006620351), где каждому образцу присваивается индивидуальный идентификационный номер.

Для тестирования микросателлитных локусов и анализа механизмов наследования по каждому из них были сделаны экспериментальные скрещивания на различных видах осетровых видов рыб, обладающих разной плоидностью. Скрещивания были проведены на осетровых хозяйствах: ООО РТФ «Диана» (Вологодская область); ФГБНУ «Биос» (Астраханская область), ФГБНУ ВНИИПРХ (Конаково, Московская область). От производителей брали фрагмент спинного плавника, молодь фиксировали на день вылупления из яйца, чтобы избежать возможного смешивания подвижных личинок. Характеристика экспериментальных скрещиваний представлена в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Характеристика тестируемых скрещиваний

№ п\п	самка	плоид-ность	самец	плоид-ность	кол-во личинок	плоид-ность
1	<i>A.baerii</i>	4n	<i>A.baerii</i> (облученный)	--	48	2n
2	<i>A.baerii</i>	4n	<i>A.baerii</i>	4n	48	4n
3	<i>A.baerii</i>	4n	<i>A.ruthenus</i>	2n	93	3n
4	<i>A.gueldenstaedtii</i>	4n	<i>A.gueldenstaedtii</i>	4n	8	4n
5	<i>A.ruthenus</i>	2n	<i>H.huso</i>	2n	14	2n
6	<i>A.stellatus</i>	2n	<i>A.ruthenus</i>	2n	14	2n
7	<i>A.stellatus</i>	2n	<i>A.stellatus</i>	2n	11	2n
8	<i>A.ruthenus</i>	2n	<i>H.huso</i>	2n	14	2n

Для определения генетического полиморфизма микросателлитных локусов у десяти различных видов осетровых, обитающих на территории Российской Федерации, а также изучения видоспецифичности используемых маркеров была проанализирована 3591 особь различных видов осетровых рыб (таблица 2.2.). Размеры выборок колеблются от 56 особей (для редких видов, таких как сахалинский осетр) до 1225 особей (для русского осетра).

Таблица 2.2. Характеристика исследованного материала для определения генетического полиморфизма микросателлитных локусов у десяти различных видов осетровых

Вид	Происхождение	Популяция	Количество образцов
Русский осетр <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Каспий	естественная	810
		искусственная	7
	Азов	естественная	30
		искусственная	290
	Черное море	естественная	88
Всего:			1225
Осетр сибирский <i>Acipenser baerii</i>	р.Лена	естественная	22
		искусственная	594
	р.Обь, Иртыш	естественная	14
		искусственная	91
	оз.Байкал	естественная	16
		искусственная	8
	р.Енисей	естественная	6
Всего:			751
Персидский осетр <i>Acipenser persicus</i>	Каспийское море	естественная	230
Амурский осетр <i>Acipenser schrenckii</i>	р.Амур	искусственная	58
Осетр сахалинский <i>Acipenser mikadoi</i>	о.Сахалин, р.Тумнин	естественная	19
		искусственная	37
	Всего:		
Калуга <i>Huso dauricus</i>	р.Амур	естественная	48
	р.Амур	искусственная	63
	Всего:		
Белуга <i>Huso huso</i>	Каспийское море	естественная	95
		искусственная	14
	Азовское море	естественная	61
		искусственная	94
	Черное море	естественная	28
Всего:			292

Стерлядь <i>Acipenser ruthenus</i>	р.Дон,Волга,Кубань	искусственная	420
	р.Енисей	естественная	46
Всего:			466
Шип <i>Acipenser nudiventris</i>	р.Урал	естественная	37
	Аральское море	естественная	1
		искусственная	45
Всего:			83
Севрюга <i>Acipenser stellatus</i>	Каспийское море	естественная	314
		искусственная	106
	Азовское море	естественная	33
		искусственная	73
	Черное море	естественная	23
Всего:			549
Всего образцов:			3591

Для анализа генетического полиморфизма пяти природных популяций сибирского осетра была исследована 151 особь из бассейнов рек Обь (и приток Оби р. Иртыш), Енисей, Лена, Колыма и озера Байкал. Также исследовались доместифицированные (выловленные в природной среде и выращиваемые в условиях аквакультуры) особи с документированным происхождением. Исследованный материал представлен в таблице 2.3.

Таблица 2.3. Характеристика исследованного материала сибирского осетра из природных популяций

N	Популяция	Природный источник	Образцы,шт.
1	Ленская	р. Лена	48
2	Байкальская	оз. Байкал	24
3	Обь-иртышская	р. Обь и р. Иртыш	38
4	Енисейская	р. Енисей	20
5	Колымская	р. Колыма	21
Итого			151

Для исследования генетического полиморфизма аквакультурных особей сибирского осетра собран материал из 13 различных аквакультурных хозяйств России, специализирующихся на разведении этого вида. Образцы собирались для целей молекулярно-генетической паспортизации ремонтно-маточных стад (Мюге, Барминцева, 2014; Руководство..., 2013). Исследовано

734 аквакультурных особи сибирского осетра по пяти микросателлитным локусам, изучена последовательность контрольного региона митохондриальной ДНК для 383 образцов. Собранный материал представлен в таблице 2.4.

Таблица 2.4. Характеристика исследованного материала сибирского осетра аквакультурного происхождения.

№	Аквакультурное хозяйство	Кол-во образцов	Год сбора	Год рождения рыб	Происхождение (популяция)
1	ООО "НПО "Кавитек" (Краснодарский край)	9	2006	1994-1996	ленская
2	«Алексинский химический комбинат» (Тульская область)	21	2012	2006	ленская
3	НПЦ по осетроводству «БИОС» (Астраханская область)	35	2006	1994-1996	ленская
4	ОАО «Волгореченскрыбхоз» Костромская область	50	2012	2004	ленская
5	ЗАО «ДагПИРХ» Республика Дагестан	24	2014	2007	ленская
6	ООО Рыботоварная фирма «Диана» (Вологодская область)	191	2007	1996-1997	ленская
		46	2008	2002	
7	«Конаковский завод товарного осетроводства» (Тверская область)	19	фев.2007	1990-1995	ленская
		14	дек.2007	2002	
		9	фев.2007	1990	
		9	дек.2007	1992-1994	
		34	май 2007	2001	
8	Адыгейский осетровый завод (республика Адыгея)	11	2008	2001-2002	ленская
9	Рыбоводный завод «Ярославский» (Ярославская область)	57	2013	2007-2008	ленская
	Итого	529			

10	*ООО РТФ «Диана»; Алексинский химкомбинат; Лучегорская НИРС (Тюменская область)	8 1 1	2010 2012 2007	2003 1998-2000	байкальская
	Итого	10			
11	рыбоводный комплекс «Малтат» (Красноярский край)	107	2013	2003-2005	енисейская
12	УЗВ «Пышма-96» (Тюменская область)	19	2014	2009	обь-иртышская
13	ФГБНУ «Госрыбцентр» (г.Тюмень)	69	2007	1998-2000	обь-иртышская
	Итого	88			
	ИТОГО	734			

*Также байкальский осетр содержится и на Конаковском осетровом хозяйстве, но эти особи были учтены нами при анализе природного полиморфизма сибирского осетра, так как имеют domesticiрованное происхождение, а аквакультурной линии байкальского осетра на Конаковском заводе не было создано.

2.2. Молекулярно-генетический анализ

2.2.1. Выделение ДНК

Выделение и последующую очистку ДНК из плавников осетровых рыб проводили на адсорбционных колонках PALL 5051 (AcroPrep™ 96 1 ml filter plate with 1.0 µm Glass Fibermedia, natural housing) в соответствии с протоколом Канадского центра по ДНК-штрихкодированию (http://www.ccdb.ca/docs/CCDB_DNA_Extraction.pdf) (Ivanova et al., 2006) или солевым методом (Aljanabi, Martinez, 1997) с небольшими модификациями, с контролем качества выделения на спектрофотометре SPECTRAmax PLUS 384.

Показателем чистоты служило значение соотношения коэффициента экстинкции, измеренного на спектрофотометре при длине волны 260нм (D_{260}), к коэффициенту экстинкции, измеренного при длине волны 280нм (D_{280}).

Водный раствор ДНК хранили при -20°C до использования.

2.2.2. Секвенирование контрольного региона мтДНК (D-петли)

Анализ полиморфизма митохондриальной ДНК проводился методом ПЦР с использованием праймеров:

DL651 (ATCTTAACATCTTCAGTG) и M13AHR3 (TCACACAGGAAACAG-STATGACATACCATAATGTTTCATCTACC) (Мюге и др., 2008).

ПЦР-реакции содержали около 100 нг ДНК и проводились в объеме 15 мкл (70 mM Трис-НСl (рН 8.3), 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, по 100 мкМ dNTP, по 1.5 пкМ каждого из праймеров, 1 ед. SolarTaq-полимеразы (Силекс, Москва)). Амплификацию проводили по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 95 °С – 10 мин, синтез ПЦР-продуктов (30 циклов): плавление – 94°С – 20 сек, отжиг праймеров – 52°С – 40 сек, синтез ДНК – 72 °С – 60 сек, окончательная достройка цепей: 72 °С – 10 мин. Визуализацию продуктов ПЦР проводили в 2% агарозном геле в 0.5X TBE буфере с окрашиванием бромистым этидием. Секвенирование контрольного региона митохондриальной ДНК проводилось с одной цепи с универсального праймера M13(-22) - TCACACAGGAAACAGSTATGAC (5 пкМ) на «ABI 3500 Genetic analyzer», с использованием набора реактивов BigDye™ 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: BigDye – 0.25 мкл, 5X BigDye буфер – 1.7 мкл., праймер M13(-22) -3 пкМ, вода (milliQ) до 10 мкл.

Анализ и выравнивание последовательностей проводилось с помощью биоинформационного пакета программ SeqMan®. Version 12.0. DNASTAR. Madison, WI, США.

2.2.3. Проведение микросателлитного анализа

Для определения уровня ploидности и механизмов наследования осетровых 16 микросателлитных локусов (таблица 2.5.) были тестированы на экспериментальных скрещиваниях различных видов осетровых рыб (табл.2.1.).

Таблица 2.5. Характеристика использованных микросателлитных локусов

Локус	Вид	Плоидность в статье	Источник
Afug41	<i>A. fulvensis</i> , <i>A. medirostris</i>	4n	Welsh et al., 2003
Afug51	<i>A. fulvensis</i> , <i>A. medirostris</i>	4n	Welsh et al., 2003
Afug63	<i>A. fulvensis</i> , <i>A. medirostris</i>	2n	Welsh et al., 2003
Afug65	<i>A. fulvensis</i> , <i>A. medirostris</i>	4n	Welsh et al., 2003
Afug67	<i>A. fulvensis</i> , <i>A. medirostris</i>	2n	Welsh et al., 2003
Afug95	<i>A. fulvensis</i> , <i>A. medirostris</i>	2n	Welsh et al., 2003
Afug112	<i>A. fulvensis</i> , <i>A. medirostris</i>	2n	Welsh et al., 2003
Afug113	<i>A. fulvensis</i> , <i>A. medirostris</i>	4n	Welsh et al., 2003
Afug135	<i>A. fulvensis</i>	4n	Welsh et al., 2003
	<i>A. medirostris</i>	2n	
Afug174	<i>A. fulvensis</i> , <i>A. medirostris</i>	4n	Welsh et al., 2003
An20	<i>A.naccari</i>	4n	Zane et al., 2002
An40	<i>A.naccari</i>	8n	Zane et al., 2002
AoxD161	<i>A. oxyrinchus</i>	4n	Henderson-Arzapalo et al., 2002
AoxD165	<i>A. oxyrinchus</i>	4n	Henderson-Arzapalo et al., 2002
AoxD234	<i>A. oxyrinchus</i>	4n	Henderson-Arzapalo et al., 2002
Ape32	<i>A.persicus</i>	8n	Moghim et al., 2012

В таблице 2.6. представлены последовательности праймеров исследованных микросателлитных локусов.

Таблица 2.6. Микросателлитные локусы для анализа полиморфизма осетровых видов рыб

Локус	Праймеры 5'-3'	Метка
An20	F:AATAACAATCATACATGAGGCT	HEX
	R:TGGTCAGTTGTTTTTTTATTGAT	
AfuG41	F:TGACGCACAGTAGTATTATTTATG	FAM
	R:TGATGTTTGCTGAGGCTTTTC	
AfuG51	F:ATAATAATGAGCGTGCTTTCTGTT	HEX
	R:ATTCCGCTTGCGACTTATTTA	
AoxD165	F:TTTGACAGCTCCTAAGTGATACC	TAMRA
	R:AAAGCCCTACAACAAATGTCAC	
AoxD161	F:GTTTGAAATGATTGAGAAAATGC	FAM
	R:TGAGACAGACACTCTAGTTAAACAGC	
AfuG63	F:TCCTGGCTAGCGAACGAA	FAM
	R:CTTTTAAATGGGGGACAGACTAT	
AfuG67	F:CAAAGCTAGAACAAGTAAAGAGAA	FAM
	R:GGGGTGTCTATAATAAAAAGTGC	
AfuG135	F:GCCAATTCCTGAAATATACCAG	TAMRA
	R:CGAAACCGCTTCAGACCTT	
AfuG95	F:CAGCAGAGTCTCCAGCCTTCAC	HEX
	R:CACAACCGTAACCTAGCAACACTG	
AfuG112	F:TATTGTTCTTTATGGTTATG	HEX
	R:TATTTCACTGTCTGTTGTATGTA	
AfuG113	F:CGGGTTGGTTAATGAGAGGA	FAM
	R:CCAATATTCGGAAGCGTGTG	
AfuG174	F:CAATGGGGTGGGCAAAA	FAM
	R:ATTAGGAGTATGGCAGTGTAGAAC	
AfuG65	F:CTCTGTGTATTGCGCTATTATTCA	HEX
	R:GTAGGGTGCCTGTATCATTTTGTT	
AoxD234	F:AACTGGCTTTGTGATTGATCC	TAMRA
	R:TGAAGCAAAGGGTATTATTTGAG	
Ape32	F:GTCAGATGCAGCCCTCG	HEX
	R:AGAGAGGGAGCGACAAAC	
An40	F:GGTGGAGATGCCCATCTTTAGTG	TAMRA
	R:CATCAGTGCAGACCCCAATGTAA	

Реакции амплификации проводили в конечном объеме 15 мкл (70 мМ Трис_НCl (pH 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 *Taq*-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. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в системе капиллярного электрофореза “ABI 3130 Genetic analyzer”, 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.

2.2.3.1. Определение дозэффекта аллеля в микросателлитном локусе

При определении количества аллелей в генотипе особи для полноты получения информации мы определяли так называемый дозэффект аллеля, т.е. количество аллелей одинакового размера (измеренных в парах нуклеотидов) в генотипе особи в определенном микросателлитном локусе.

Дозэффект аллеля необходимо определять только в том случае, если особь по данному локусу имеет более чем дисомное наследование. Когда аллелей только два (дисомное наследование), особь может быть либо гомозиготой, т.е. нести два одинаковых по размеру аллеля – на фореграмме это выглядит как один пик – либо гетерозиготой, т.е. нести два разноразмерных аллеля. При таком наследовании, характерном для подавляющего числа диплоидных видов, разночтений в определении генотипа особи быть не должно.

Однако для полиплоидов, если локус имеет тетрасомное наследование, то особь имеет набор из 4-х аллелей. Но на фореграмме мы можем увидеть у различных особей от одного до четырех аллелей. Четыре аллеля мы наблюдаем, когда особь по данному локусу имеет все аллели разного размера. Классическое распределение размеров аллеля, каждый из которых представлен в дозеэффекте 1 (ABCD), на электрофореграмме выглядит как представлено на рис. 2.1.

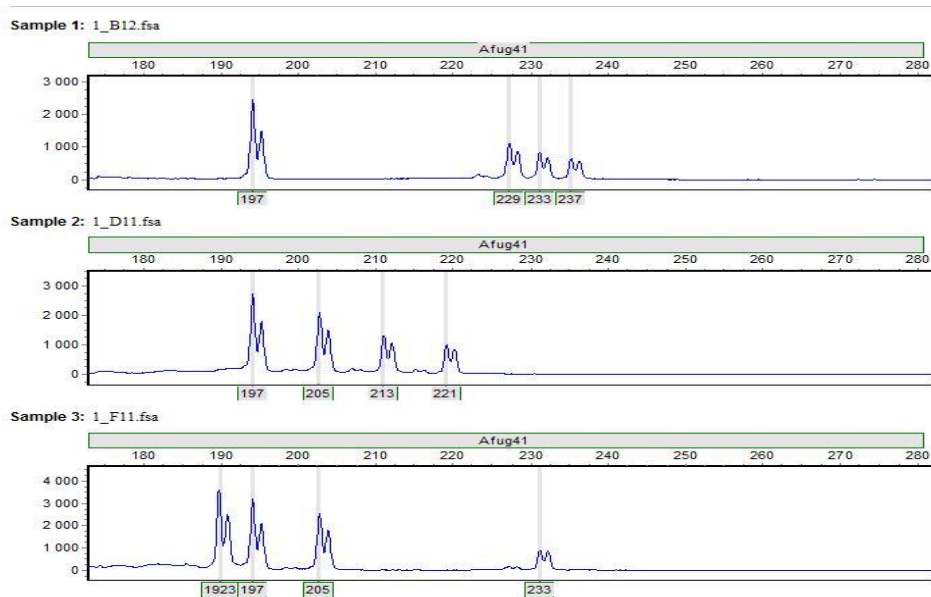


Рисунок 2.1. Электрофореграмма генотипов трех особей сибирского осетра, несущих аллели в соотношении 1:1:1:1 по локусу Afug41.

Чем меньше размер аллеля, тем он выше относительно других аллелей, имеющих дозеэффект 1 («эффект загрузки»). Это связано с тем, что при электрокинетической инъекции вероятность загрузки более коротких отрицательно заряженных молекул выше, чем более длинных молекулярных фрагментов. Поэтому при их равном количестве более короткие фрагменты загружаются с большей скоростью и на фореграмме мы видим постепенное уменьшение уровня (высоты) полученного пика с увеличением длины аллеля. Следует подчеркнуть, что сравнение по высотам пиков проводится только между аллелями, принадлежащими одной особи.

При крайнем случае генотипа, когда все четыре аллеля имеют одинаковый размер, что достаточно редко встречается у полиплоидов, т.е. особь гомозиготна по данному аллелю, на фореграмме мы видим только один пик (рис.2.2.). Дозэффект этого аллеля – 4 (AAAA). Особенность PCR и электрофоретического разделения микросателлитных локусов в капиллярном электрофорезе приводит к тому, что одиночный пик часто представлен дополнительным пиком, находящимся на расстоянии 1 нуклеотида от остального (т.н. statter band), и его легко отличить от двух соседних аллелей, находящихся друг от друга на 2-6 нуклеотидов. Форма пика часто характерна для локуса, и такие "раздвоенные" пики интерпретируются как одиночный пик. В нашей работе большинство локусов имеют шаг в четыре нуклеотида (тетрануклеотидные микросателлитные локусы).

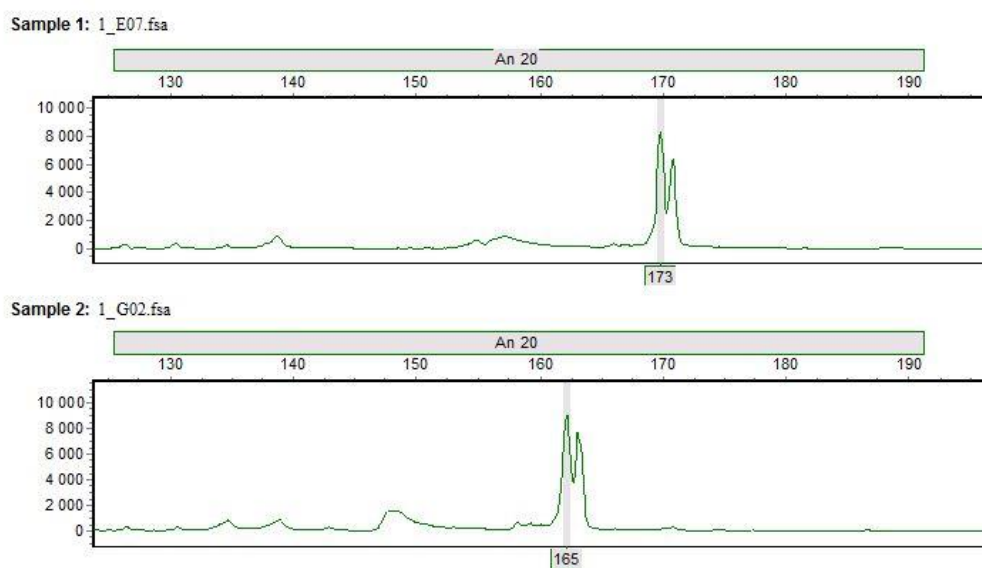


Рисунок 2.2. Электрофореграмма генотипов двух особей сибирского осетра, имеющих гомозиготу по локусу An20.

Во всех других вариантах по высоте полученного пика мы определяем, какой аллель встречается в генотипе особи два или три раза.

Рассмотрим вариант, когда на фореграмме мы видим два аллеля. Это может быть в случае, когда дозэффект каждого аллеля равен двум, т.е. в генотипе особи каждый аллель представлен два раза (AABB). В данном

случае аллели должны иметь приблизительно одну высоту, или, при значительном расстоянии между ними, следовать классическому уменьшению высоты пика аллеля более длинного размера. (рис.2.3.)

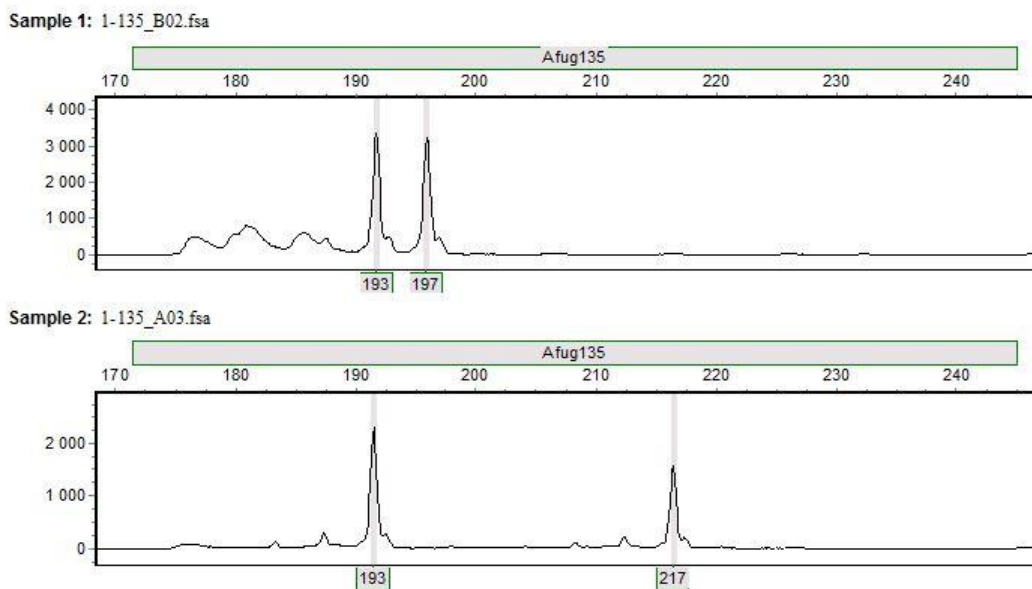


Рисунок 2.3. Электрофореграмма генотипов двух особей сибирского осетра, несущих аллели в соотношении 2:2 по локусу Afug135.

Два аллеля на фореграмме мы видим и в случае распределения аллелей 1:3 (ABBB) или 3:1 (AAAB). (рис. 2.4). Аллель, имеющий дозэффект-1 значительно меньше, чем, аллель, имеющий дозэффект -3.

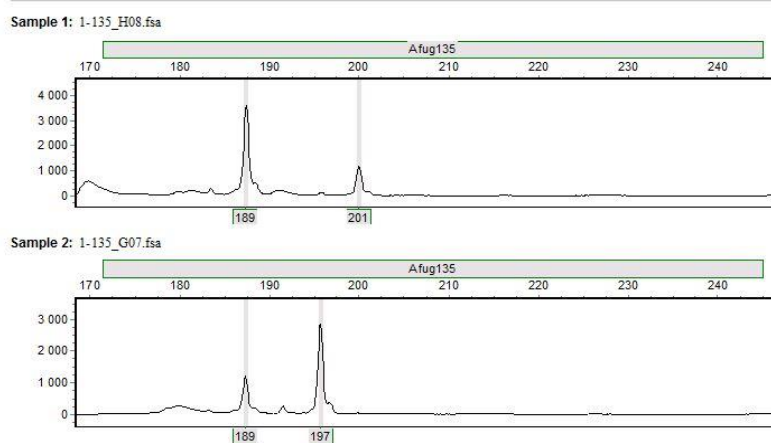


Рисунок 2.4. Электрофореграмма генотипов двух особей сибирского осетра, несущих аллели в соотношении 3:1(sample1) и 1:3(sample2) по локусу Afug135.

Более сложным вариантом является такое распределение аллелей, когда один из аллелей имеет дозэффект-2, а два других аллеля – дозэффект-1.

На рисунке 2.5. представлен вариант соотношения аллелей 1:1:2 (ABCC). Аллель с дозэффектом-2 имеет высоту приблизительно в два раза выше, чем аллели, имеющие дозэффект-1. А аллели с одинаковым дозэффектом один имеют приблизительно равную высоту с учетом, что более короткий аллель чуть лучше загружается и поэтому чуть выше ("эффект загрузки").

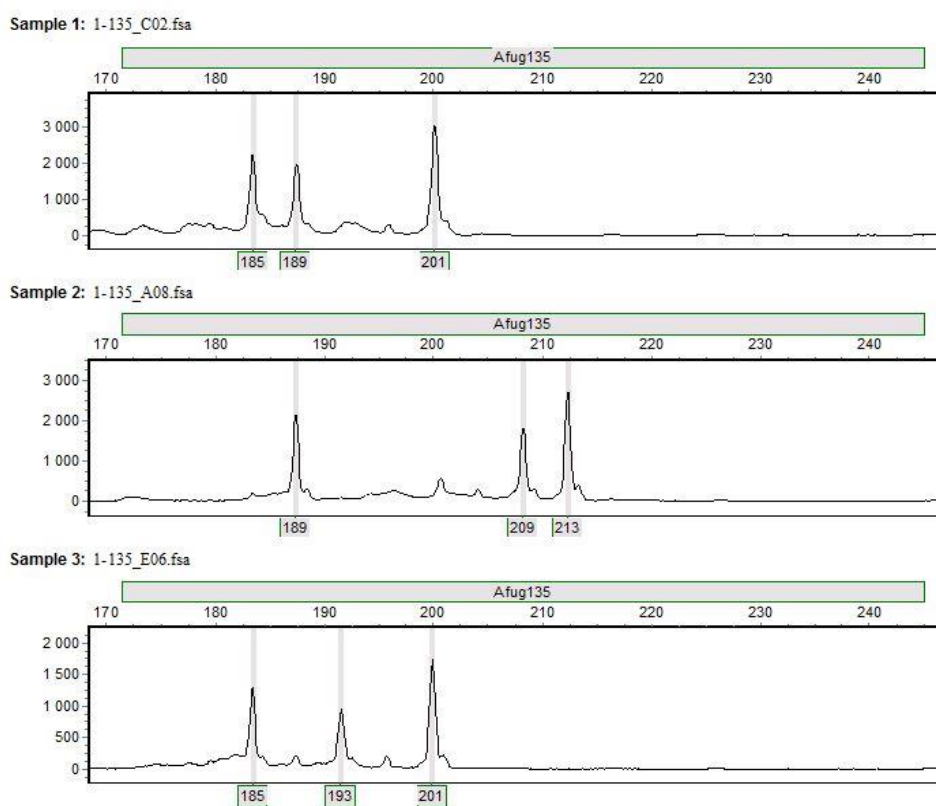


Рисунок 2.5. Электрофореграмма генотипов трех особей сибирского осетра, несущих аллели в соотношении 1:1:2 по локусу Afug135.

Таковую же картину мы наблюдаем при соотношении аллелей 1:2:1 (ABCC) (рис.2.6.) и 2:1:1 (AABC) (рис.2.7.).

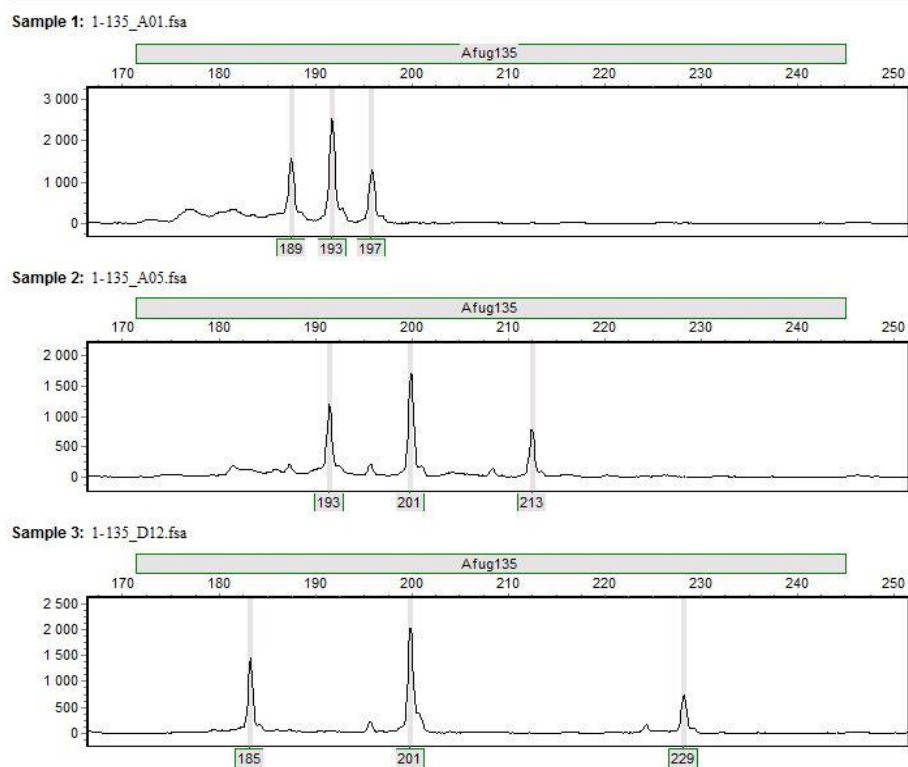


Рисунок 2.6. Электрофореграмма генотипов трех особей сибирского осетра, несущих аллели в соотношении 1:2:1 (ABBC) по локусу Afug135.

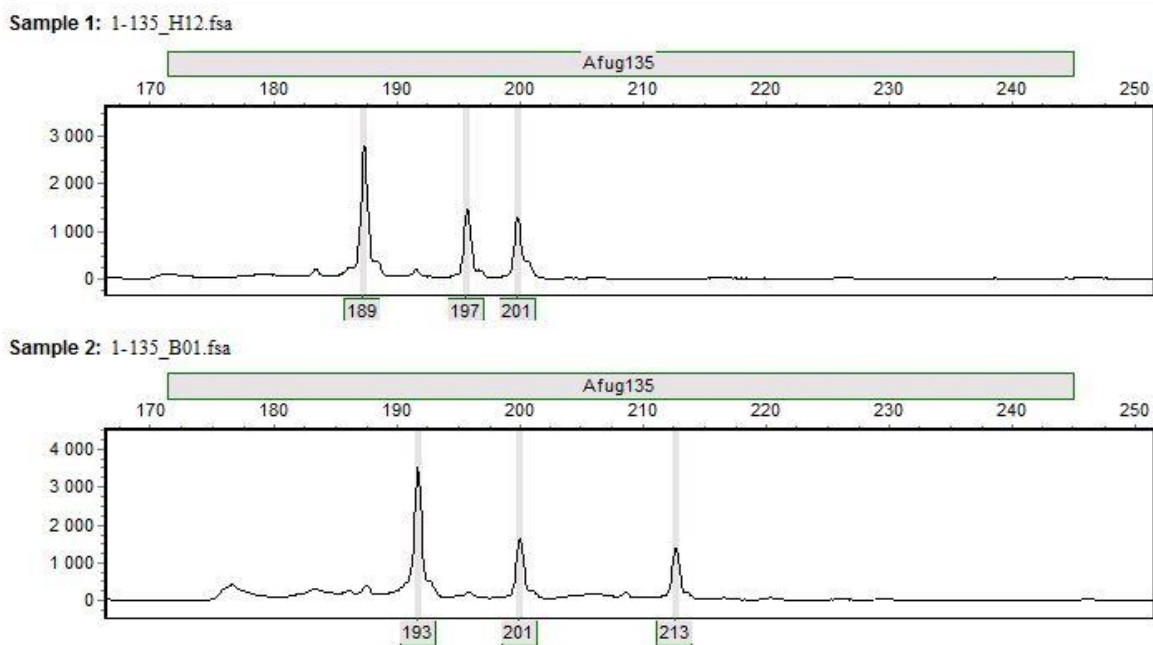


Рисунок 2.7. Электрофореграмма генотипов двух особей сибирского осетра, несущих аллели в соотношении 2:1:1 (AABC) по локусу Afug135.

Достаточно сложно определить дозэффект аллелей, если их размеры у одной особи отличаются на 100 и более пн, так как на электрофореграмме такие аллели даже с одинаковым дозэффектом имеют значительную разницу в высоте пика из-за «эффекта загрузки». Но это достаточно редкий случай, и для генотипирования осетровых мы выбрали локусы, не имеющие такой большой размерной разницы между аллелями.

В нашей работе при анализе генотипов особей нами учитывался дозэффект, рассчитанный по схеме, описанной выше. Это позволило максимально использовать получаемую информацию от результата генотипирования особей по исследуемым микросателлитным локусам.

Например, особи с представленными генотипами на рисунке 2.8. без

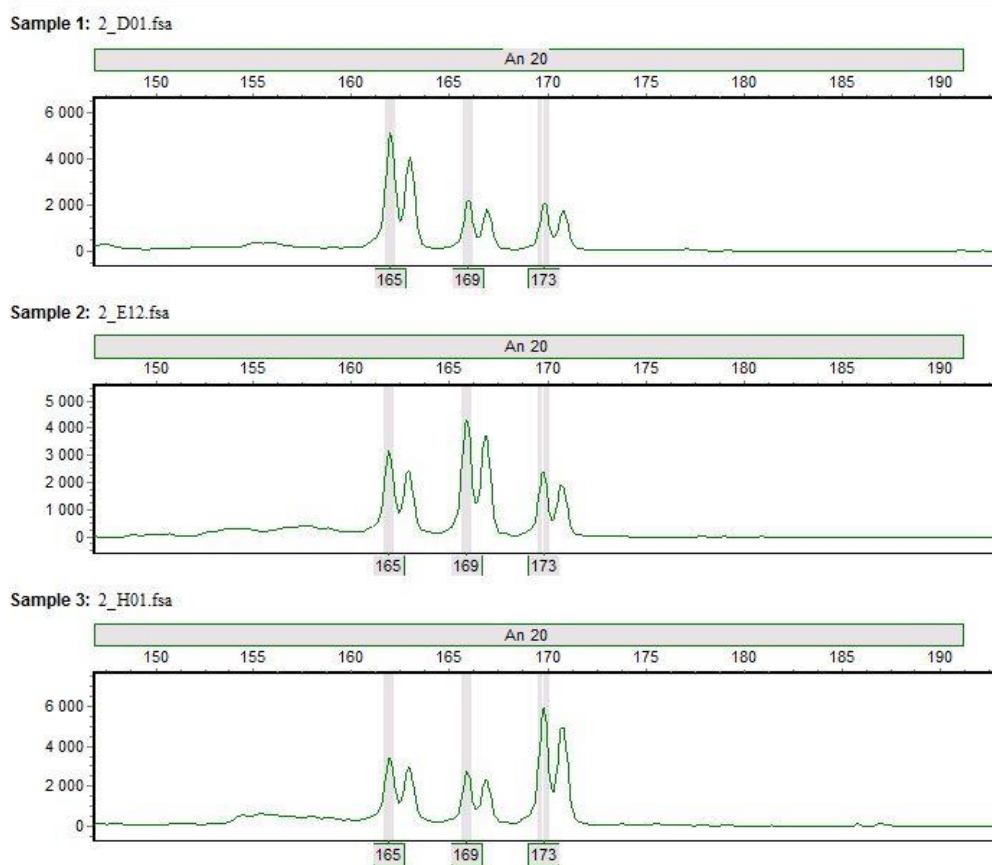


Рисунок 2.8. Электрофореграмма генотипов трех особей сибирского осетра, несущих одинаковый набор аллелей, но имеющих различный дозэффект (sample1 – AABC; sample2 – ABBC; sample3 – ABCC) по локусу An20.

учета дозэффекта несут один и тот же набор аллелей, а с учетом дозэффекта все три особи несут разный генотип, что позволяет сделать более точный расчет дифференциаций различного уровня – от индивидуального до популяционного.

Многие исследователи полиплоидных видов избегают учитывать дозэффект аллелей, предпочитая терять некоторую часть информации, в которой у них нет 100% уверенности или же высчитывают возможный дозэффект по частоте встречаемости родительских аллелей в потомстве (Rodzen, May, 2002; Schreier et al., 2011). Но данный метод можно применить только при анализе имеющихся родителей и полученного от них следующего поколения. При популяционных исследованиях его применение невозможно.

2.2.3.2. Постановка мультиплексной ПЦР

Для настоящей работы для целей генотипирования и популяционного анализа осетровых использовали набор из пяти микросателлитных локусов (Afug41, Afug51, An20, AoxD161, AoxD165). Данные пять локусов были отобраны по результатам предварительного тестирования 16 локусов по принципу высокой воспроизводимости амплификации, наибольшего полиморфизма, соответствия равновесию Харди-Вайнберга и по отсутствию нуль-аллелей у большинства видов, обитающих в России, а также диапазону распределения аллелей, дающему возможность постановки всех этих локусов в одной реакции.

Были подобраны условия для постановки мультиплексной реакции:

Реакцию также проводили в конечном объеме 15 мкл (70 мМ Трис_НСl (рН 8.6); 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄; 1.8 мМ MgCl₂; по 400 мкМ каждого dNTP; 1 пкМ праймеров An20, AoxD161 каждого, 2пкМ праймеров Afug41, Afug51 каждого, и 3 пкМ праймера AoxD165, модифицированных на 5' конце флуоресцентным красителем FAM, HEX или TAMRA; 4 пкМ обратного (немеченного) праймера; 50–100 нг ДНК; 0.8 единиц *Taq*-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 водой до 115 мкл водой (milliQ), затем по 1,2 мкл разбавленной реакции переносили в 12 мкл формамида HiDi с добавленным молекулярным стандартом для определения размера амплифицируемых фрагментов ДНК. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в системе капиллярного электрофореза “ABI 3130 Genetic analyzer”, определение длин аллелей осуществляли с применением программного обеспечения GeneMarker (Version 1.2). Для определения количественного аллельного состава особи, если ее генотип содержит аллели одного размера, применялась методика подсчета дозэффекта аллеля.

2.3. Статистическая обработка данных

Определение вероятности принадлежности особей к каждой из предполагаемых популяций проводилось в программе Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) при параметрах 1000000 МСМС шагов, исключая первые 100000. Определение оптимального количества кластеров (ΔK) проведено в программе Structure Harvester (Earl, Von Holdt, 2012). Статистические данные (F_{ST} , частоты аллелей) получены с помощью программ Polysat и SPAGeDi (Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity), которые позволяют работать с полиплоидами (Clark, Jasieniuk, 2011; Hardy, Vekemans, 2002), построение PCoA проводилось в GenAlex (Peakall, Smouse, 2006) по полученным в SPAGeDi значениям F_{ST} .

Анализ и выравнивание последовательностей проводилось с помощью биоинформационного пакета программ SeqMan®. Version 12.0. DNASTAR.

Madison, WI, США. Гаплотипная сеть построена с помощью программы TCS (Clement et al., 2000), анализ межпопуляционной изменчивости проводился методом AMOVA (анализ дисперсии молекулярного разнообразия), реализованном в программе Arlequin v.3.5 (Excoffier, Lischer, 2010). Данный метод позволяет оценить вклад как индивидуальной, так и групповой (популяционной) вариабильности в общую генетическую изменчивость вида. Анализ попарных расстояний (mismatch distribution), гаплотипное разнообразие (Hd) и стандартное отклонение (Sd) посчитаны в программах Arlequin и DNAsp 5.10.1. (Rozas, 2009).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ВЫБОР МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ И ХАРАКТЕР ИХ НАСЛЕДОВАНИЯ

Широкомасштабное исследование различных видов растений и животных по микросателлитным локусам выявило некоторые проблемы, связанные с возникновением в некоторых выборках по отдельным локусам отклонения от равновесия Харди-Вайнберга. Использование таких данных может привести к некорректным статистическим расчетам и неправильной интерпретации популяционных данных (Callen et al., 1993; Carlsson, 2008; Zhan et al., 2009).

Для подготовки панели из нескольких микросателлитных локусов, для анализа естественных популяций и аквакультурных стад сибирского осетра, мы провели тестирование 16 ранее опубликованных микросателлитных локусов на характер их наследования - дисомный, тетрасомный, диплоидизированный тетрасомный или октасомный (с разной степенью диплоидизации последнего), а также на соответствие наследования аллелей в экспериментальных скрещиваниях распределению по Харди-Вайнбергу, отсутствию нуль-аллелей и степени полиморфизма у данного вида.

Отклонения от равновесия Харди-Вайнберга могут появляться по разным причинам. Локус может не отвечать критерию нейтральности и находиться под действием отбора, хотя в большинстве случаев микросателлиты располагаются в некодирующей области и считаются селективно нейтральными. Также может наблюдаться эффект Валунда, если в выборке собраны особи из нескольких популяций, в которых частоты аллелей отличаются. Также к отклонению от ожидаемого распределения частот приводит наличие в локусе неамплифицируемого "нуль-аллеля".

Одним из наиболее частых случаев, объясняющих снижение наблюдаемого числа гетерозигот в сравнении с ожидаемым, является

присутствие неамплифицируемых нуль-аллелей в исследуемых локусах. Проблема нуль-аллеля заключается в том, что, при амплифицировании микросателлитных локусов может возникать явление, известное как «*allele dropout*». «Выпадение аллеля» происходит из-за возникновения мутации, (это может быть как единичная замена, так и инсерция, делеция или инверсия) в области гибридизации праймера на фланкирующую последовательность микросателлита. Из-за наличия этих мутаций праймер не отжигается на нужном участке ДНК исследуемого образца. Это приводит к тому, что не происходит амплификации продукта и становится невозможным детектировать этот аллель. Такое явление принято называть нуль-аллелем. Наличие нуль-аллеля приводит к завышению наблюдаемой гомозиготности, что может иметь серьезный эффект на интерпретацию распределения частот в выборке. Если же частота мутации, приводящей к появлению нуль-аллеля, высока, то становится вообще невозможным детектировать у некоторых образцов генотип по данному локусу, так как «нуль-аллель» может находиться на обеих хромосомах индивидуума и приводить к отсутствию амплификации и аллельного пика на фореграмме.

Все это приводит к некорректной интерпретации популяционных данных (Callen et al., 1993; Carlsson, 2008). Так, при изучении японского гребешка (*Chlamys farreri*) было показано экстремально высокое количество нуль-аллелей - 56,2% микросателлитных локусов имели нуль-аллели, что вызвало сильные искажения в объяснении популяционной структуры этого вида (Zhan et al., 2009).

Чтобы избежать возможной ошибки в интерпретации полученных данных микросателлитного анализа по межвидовой и внутривидовой изменчивости осетровых, мы достаточно подробно изучили наследование каждого локуса перед тем как использовать их для создания панели для наших исследований.

Рассмотрим в общем случае возможные варианты наследования аллелей у многохромосомных видов осетровых (в данном случае считаем их тетраплоидами, хотя в дальнейшем мы покажем, что некоторые локусы сохранили октаплоидную природу, сохраненную с первого раунда дупликации генома (переходе от ~60 к ~120 хромосомам). При автополиплоидизации каждый из диплоидных локусов удваивается, и в дальнейшем возможны несколько сценариев развития:

1. Гомология между всеми четырьмя сестринскими хроматидами сохраняется, в мейозе формируется или тетрадное сочетание хроматид или случайным образом два парных, и в результате из четырех родительских аллелей (назовем их А,В,С,Д) в гамете возможна с равной вероятностью любая комбинация (из возможных шести), состоящая из двух аллелей, случайным образом выбранных из родительского четырех-аллельного генома. Распределение возможных гамет при родительском геноме ABCD будет АВ, АС, АД, ВС, ВД, СД в пропорции 1:1:1:1:1:1. Такой тип наследования мы будем называть тетрадным.

2. Как известно, у большинства видов животных, прошедших геномную дупликацию, со временем наблюдается частичная или полная диплоидизация тетраплоидных локусов, что связано с накоплением изменений в ранее идентичных хромосомах. В результате при формировании веретена деления, формируется не тетрада из четырех сестринских хромосом, а синаптонемный комплекс формирует две определенные пары, т.е первоначально дублированная пара хромосом начинает вести себя как две диплоидные пары. В примере родительской особи с аллелями ABCD, диплоидизация проявляется в том, что в одну гамету не могут попасть два аллеля, находящиеся на одной диплоидизированной паре хромосом. Если на одной паре сестринских конъюгирующих хромосом находятся аллели А и В, а на другой паре С и

D, то в образующихся гаметах возможны комбинации аллелей AC, AD, BC, и BD, но никогда не встретятся аллели AB и CD. Этот вариант наследования мы будем в дальнейшем называть диплоидизированный тетраплоидный локус.

Если локус является тетрасомным диплоидизированным, то при родительском генотипе ABCD возможно три варианта распределения аллелей.

а. Сестринские хроматиды несут аллели A/B и C/D. В этом случае ожидаемое распределение по гаметам следующее AC:BC:AD:BD в отношении 1:1:1:1, комбинации AB и CB отсутствуют.

б. Сестринские хроматиды несут аллели A/C и B/D. В этом случае ожидаемое распределение аллелей будет AB:AD:BC:CD в отношении 1:1:1:1. Комбинация AC и BD отсутствуют.

с. Сестринские хроматиды несут аллели A/D и B/C. В этом случае ожидаемое распределение аллелей будет AB:AC:CD:BD в отношении 1:1:1:1. Комбинации AD и BC отсутствуют.

3. Следующим этапом дивергенции между тетраплоидными сестринскими хромосомами может быть или потеря одной пары сестринских хромосом, или потеря микросателлитного локуса на одной паре (делеция всего локуса, мутации на фланкирующем участке, что препятствует отжигу праймеров). В этом случае у многохромосомного вида наблюдается всего два аллеля, распределение которых в потомстве соответствует нормальному диплоидному. Такой локус называется полностью диплоидизированным, или просто диплоидным.

Для получения картины наследования у многохромосомных видов, нами исследованы несколько экспериментальных скрещиваний с участием сибирского осетра.

Также мы изучили несколько скрещиваний малохромосомных видов друг на друга – стерлядь на белугу, севрюга на стерлядь и севрюга

на севрюгу (по традиции, принятой в рыбоводстве, в родительской паре сначала указывается материнская, затем отцовская особь).

Размеры аллелей и плоидность родительских особей в экспериментальных скрещиваниях по каждому локусу указана в таблице S1 в приложении. Размеры аллелей указаны в парах нуклеотидов (пн), в дальнейшем при анализе распределения генотипов в F_1 для удобства использовали условные буквенные обозначения аллелей.

Локус AoxD161

При скрещиваниях между $2n$ -видами - самки стерляди на самца белуги (скрещивание 5), самки севрюги на самца стерляди (скрещивание 6), а также между двумя севрюгами (скрещивание 7) – мы получили потомство с ожидаемой плоидностью $2n$ и без отклонений от равновесия по Харди-Вайнбергу (данные не показаны), что свидетельствует о диплоидном характере наследования данного локуса у малохромосомных видов.

У многохромосомных видов картина получилась иная:

Скрещивание 1. Анализируя потомство самки сибирского осетра, имеющей плоидность $4n$ (ABCC), оплодотворенной облученной (стерильной) спермой конспецифичного самца, мы получили гаплоидное потомство ($2n$) (47 шт.), которое из возможных четырех различных гамет образует только две – AC-19 шт. и BC-28 шт. и не образует гаметы AB и CC. Наблюдаемое и ожидаемое распределение аллелей в потомстве приведено в таблице 3.1. Так как самка несет больше двух аллелей, то вариант наследования как полностью диплоидный сразу отбрасывается. Остается или тетрадное наследование (все шесть комбинаций, в данном случае AB, 2AC, 2BC, CC), или диплоидизированное. Если локус является тетрадомным диплоидизированным, то возможны два варианта распределения аллелей ABCC между сестринскими хроматидами: первый состоит в том, что сестринские хроматиды несут аллели A/B и C/C (ожидаемое

распределение по гаметам AC и BC в отношении 1:1, гаметы AB и CC отсутствуют). Вторым вариантом - сестринские хроматиды несут аллели A/C и B/C (ожидаемое распределение аллелей будет AB:AC:BC:CC в отношении 1:1:1:1). Как видно из таблицы 3.1., тест Хи-квадрат указывает, что наблюдаемое распределение гамет не противоречит первому варианту (A/B и C/C).

Скрещивание 2. Потомство от скрещивания двух сибирских осетров AADC и ABCC (48 шт.) из возможных 16-ти генотипов образует только 4. (табл. 3.1.).

Скрещивание 3. Потомство от скрещивания самки сибирского осетра (4n) на самца стерляди (2n) (92 шт.) имеет 3n набор 4-х различных вариантов генотипов из восьми возможных. (табл. 3.1.) у 90 личинок. У двух личинок наблюдается 5n генотип, состоящий из полного не разошедшегося генотипа самки и 1n самца стерляди.

Таким образом, в локусе AoxD161 особь сибирского осетра имеет от 1 до 4 аллелей, но при образовании гамет может образовывать не все возможные варианты, только гомологичные хромосомы могут объединиться в одну гамету.

Проведя тест на хи-квадрат мы подтвердили тетрасомный диплоидизированный характер наследования у потомства многохромосомного сибирского осетра.

Таблица 3.1. Наследование аллелей в локусе AoxD161 в экспериментальных скрещиваниях

номер скрещ.	вид	пол	генотип	гаметы	набл	ожд			ожд 4n	модель1 Хи²	модель 2 и 3 Хи²	Модель4 Хи²			
						2x2n 1/2 3/4	2x2n 1/3 2/4	2x2n 1/4 2/3							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
1	сибирский осетр1	самка	ABCC	AC	19	24	12	12	16	0,631743	1,26333E-05	0,016392			
				BC	28	24	12	12	16						
				самец не участвует оплодотворение облученной спермой			CC						12	12	8
				AB			12	12	8						
2	сибирский осетр2	самка	ABCC	AB			12	12	8	0,999709	2,498E-05	0,037868			
				AC	24	24	12	12	16						
				CC			12	12	8						
				BC	24	24	12	12	16						
	сибирский осетр3	самец	AACD	AA			12	12	8	0,826326	1,21362E-05	0,018446			
				AD	27	24	12	12	16						
				AC	21	24	12	12	16						
				DC			12	12	8						
3	сибирский осетр4	самка	AABC	AA			22	22	15	0,892505	2,01099E-09	0,002243			
				AB	50	45	23	23	30						
				AC	40	45	22	22	30						
				BC			23	23	15						
				AABC	2										
	стерлядь5	самец	DE	D	47				46						
				E	45				46						

В таблице 3.1. представлено как наблюдаемое распределение аллелей (столбец 6), так и ожидаемое распределение при тетрадном (столбец 10) и в трех возможных случаях диплоидизированного наследования (столбцы 7-9), а также представлена статистическая достоверность отклонения от равновесия Харди-Вайнберга наблюдаемого и трех ожидаемых типов наследования гамет по критерию χ^2 (столбцы 11-13). Как видно из таблицы, для всех трех экспериментов на сибирском осетре достоверным (отсутствие значимого отклонения) является диплоидизированное тетрасомное наследование.

Следует отметить, что исследование распределения аллелей в экспериментальных скрещиваниях позволило выявить часто встречающиеся аномалии при гаметогенезе, а именно нерасхождение при гаметогенезе самки части сестринских хроматид. В скрещивании № 3 сибирского осетра на стерлядь нами выявлено две особи потомков-пентаплоидов с гаметой AABC самки и аллелем D или E самца стерляди. Всего нерасхождение аллелей нами наблюдалось для большого числа локусов и достигало до 10% всех гамет, причем встречается как у много- так и у малохромосомных видов. Следует отметить, что этот феномен нами наблюдался только у самок, у самцов нерасхождение хромосом в гаметогенезе нами не отмечено.

Локус Afug41

При скрещиваниях между 2n-видами мы получили потомство с ожидаемой ploидностью 2n и без отклонений от равновесия по Харди-Вайнбергу (данные не показаны), что свидетельствует о диплоидном характере наследования данного локуса у малохромосомных видов.

Данные, полученные на многохромосомных видах, представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2. Наследование аллелей в локусе Afug41 в экспериментальных скрещиваниях

номер скрещ.	вид	пол	генотип	гаметы	набл	ожд 2x2n 1/2 3/4	ожд 2x2n 1/3 2/4	ожд 2x2n 1/4 2/3	ожд 4n	модель1 Хи ²	модель 2 и 3 Хи ²	Модель4 Хи ²
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
2	сибирский осетр2	самка	AABC	AB	14	24	11	11	15	0	0,005284	0,185545
48 лич.				AC	20	24	12	12	16			
				BC	9	0	12	12	7			
				AA	3	0	11	11	8			
				AABC	2							
	сибирский осетр3	самец	DCEF	DC	3	0	12	12	8	0	0	0,170562
				EF	12	0	12	12	8			
				DE	12	12	0	12	8			
				DF	7	12	12	0	8			
				CE	6	12	12	0	8			
				CF	8	12	0	12	8			
3	сибирский осетр4	самка	ABBC	AB	21	21	21	42	28	0	0	0,113361
92 лич.				AC	14	21	21	0	14			
				BB	11	21	21	0	14			
				BC	38	21	21	42	28			
				ABBC	9							
	стерлядь5	самец	DE	D	47	46			46			
				E	46	47			46			

Скрещивание 1. Анализируя потомство (48 шт.) самки сибирского осетра, имеющей плоидность $4n$ (AABC), оплодотворенной облученной спермой конспецифичного самца, мы получили гаплоидное потомство ($2n$) в любых возможных вариациях – AA - 6 шт. AB - 28 шт. AC - 9 шт. BC - 4 шт. (данные в табл 3.2 не приведены).

Скрещивание 2. Потомство от скрещивания двух сибирских осетров самки AABC и самца DCEF также образует все возможные $4n$ генотипы. Две личинки несут гексаплоидный набор ($6n$), состоящий из разошедшихся хромосом матери и $2n$ набор от самца. (табл. 3.2.)

Скрещивание 3. Потомство от скрещивания самки сибирского осетра ($4n$) на самца стерляди ($2n$) имеет $3n$ всех возможных вариантов генотипов (табл.3.2.) у 84 личинок. У девяти личинок наблюдается $5n$ генотип, состоящий из полного не разошедшегося генотипа самки и $1n$ самца стерляди.

Следовательно, сибирский осетр по локусу Afug41 может иметь до 4 аллелей и образует все возможные варианты гамет, т.е. наследуется по тетрадному механизму, соединяться в одну гамету могут как сестринские так и гомологичные хромосомы.

Проведя тест на хи-квадрат мы подтвердили тетрадный характер наследования у потомства сибирского осетра для данного локуса.

Локус An20

При скрещиваниях между $2n$ -видами мы получили потомство с ожидаемой плоидностью $2n$ и без отклонений от равновесия по Харди-Вайнбергу (данные не показаны), что свидетельствует о диплоидном характере наследования данного локуса у малохромосомных видов.

Данные, полученные на многохромосомных видах, представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3. Наследование аллелей в локусе An20 в экспериментальных скрещиваниях

номер скрещ.	вид	пол	генотип	гаметы	набл	ожд 2x2n 1/2 3/4	ожд 2x2n 1/3 2/4	ожд 2x2n 1/4 2/3	ожд 4n	модель1 Хи ²	модель 2 и 3 Хи ²	Модель4 Хи ²
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	сибирский осетр1	самка	ABBC	AB	15	12	12	24	16	0,425606	0	0,863804
				AC	10	12	12	0	8			
	самец не участвует оплодотворение облученной спермой			BB	8	12	12	0	8			
				BC	14	12	12	24	16			
3	сибирский осетр4	самка	ABCC	AB	18	0	22	22	15	0	0,27657	0,461534
93лич.				AC	29	44	22	22	29			
				BC	26	44	22	22	29			
				CC	20	0	22	22	15			
				ABCC	5							
	стерлядь5	самец	DE	D	43							
				E	50							

Скрещивание 1. Анализируя потомство самки сибирского осетра, имеющей ploidy $4n$ (ABBC), оплодотворенной облученной спермой конспецифичного самца, мы получили гаплоидное потомство ($2n$) в любых возможных вариациях – АВ-15 шт. АС-10 шт. ВВ-8 шт. ВС-14 шт.

Скрещивание 3. Потомство из 88 личинок от скрещивания самки сибирского осетра ($4n$) на самца стерляди ($2n$) имеет все возможные варианты триплоидных генотипов (табл. 3.3.). У пяти личинок наблюдается $5n$ генотип, состоящий из полного нераззошедшегося генотипа самки и гаплоидного набора самца стерляди.

Следовательно, сибирский осетр по локусу An20 может иметь до 4 аллелей и образует все возможные варианты гамет. Как видно из таблицы 3.3., тест на хи-квадрат для наших экспериментальных скрещиваний не дает возможности достоверно отклонить все кроме одной альтернативные гипотезы, однако распределение частот гамет дает возможность предположить, что локус An20 у сибирского осетра, также как и предыдущий, имеет тетрадный характер наследования. Вероятность того, что этот локус наследуется не как тетрадный а как диплоидизированный тетрасомный - много меньше (табл.3.3).

Локусы Afug51 и AoxD165

У потомства обнаружены все возможные гаметы, тест на хи-квадрат подтверждает тетрадный характер наследования этих локусов. Также в потомстве обнаружены особи, несущие увеличенный набор хромосом в результате наследования полного набора самки, как в скрещиваниях сибирского осетра на стерлядь, где потомство образует $5n$ -гаплотип, так и в скрещиваниях сибирского осетра между собой – $6n$ -гаплотип. (Таблицы S2 и S3 в приложении).

Локус Afug67

Для других видов в литературе описан как дисомный локус для тетраплоидных видов (табл. 2.5.). У сибирского осетра имеет более двух аллелей на локус, но гораздо менее полиморфный, чем описанные выше

локусы. Только в одном скрещивании между двумя сибирскими осетрами мы обнаружили генотипы у самки ABBD, у самца BCDD, что дает возможность говорить о тетраплоидном характере наследования данного локуса у сибирского осетра, так как потомство образует все возможные гаметы.

На примере скрещивания малохромосомных видов (табл. 3.4.) - два скрещивания самка стерляди на самца белугу (№5 и №8) и самка севрюги на самца стерляди (№6) нами был обнаружен нуль-аллель в двух скрещиваниях из трех, вследствие чего мы исключили этот локус из возможной панели локусов для дальнейшей работы.

Таблица 3.4. - наследование аллелей (размеры в п.н.) в скрещиваниях малохромосомных видов по локусу Afug67.

скрещивание 5	самка RUT		2x186
	самец HUS	0 190	5 8
скрещивание 6	самец RUT		2x186
	самка STE	182 0	8 5
скрещивание 8	самец HUS		2x190
	самка RUT	186 194	7 7

Локус Afug95

Описан в литературе как дисомный локус на озерном и зеленом осетре. (табл. 2.5.). Практически у всех исследованных нами видов более 90% особей имеют в своем генотипе один и тот же аллель размером 217 п.н.

В исследованных скрещиваниях сибирского осетра нами выявлено всего два аллеля - 217 и 221 п.н., но дозэфект этих аллелей у некоторых особей 3:1, что косвенно говорит о тетрасомности локуса. Мы не стали подробно исследовать этот локус, так как он явно не подходит для использования в популяционных исследованиях как недостаточно полиморфный.

Локус Afug63

Описан в литературе как дисомный локус на озерном и зеленом осетрах (табл. 2.5.).

В настоящей работе мы обнаружили, что несмотря на то, что самка сибирского осетра (скрещивание 3) несет только два аллеля в своем генотипе, некоторые из потомков несут более двух аллелей, что подтверждает тетрасомность этого локуса. (данные не представлены) .

Но на примере скрещивания двух сибирских осетров (скрещивание 2) обнаружили присутствие нуль-аллеля, что исключает его из возможных локусов для популяционного исследования сибирского осетра. Генотипы полученных потомков, гомозиготных по аллелям 114 и 138 можно объяснить только присутствием нуль-аллеля в генотипе самца (114/0, 138/0). Также из таблицы видно, что локус не образует все возможные гаметы, т.е наследование идет как у тетрасомного диплоидизированного локуса (таблица 3.5.).

Таблица 3.5. Решетка Пеннета для скрещивания 2 двух сибирских осетров (48 личинок) по локусу Afug63.

самец/самка	130/130	130/0	0/0
114/114	10	0	10
114/138	0	0	0
138/138	12	0	16

Таким образом, из-за присутствия нуль-аллеля этот локус не подходит для решения поставленных целей.

Локус Afug135

В литературе описан как тетрасомный локус у озерного осетра и всего на двух экземплярах зеленого осетра описан как дисомный локус. (табл. 2.5.).

По нашим данным этот локус у разных видов находится на разной стадии эволюционного развития. У многохромосомных осетров атлантической клады – русского и сибирского осетра – этот локус наследуется по тетрасомному принципу (табл. 3.6.), а у тихоокеанской клады – амурского осетра и калуги – имеет октасомный механизм наследования (данные не приводятся). У

малохромосомных видов, таких как стерлядь и белуга наследование происходит как у диплоидизированных тетрасомных локусов, т.е. образуются не все варианты гамет, а только те, которые находятся не на сестринских хроматидах. (табл. 3.6.) Однако у севрюги локус уже полностью диплоидизирован и ведет себя как обычный дисомный локус у малохромосомных видов (данные не представлены).

Как видно из таблицы 3.6., у русского и сибирского осетра наибольшая вероятность наследования по тетрадному механизму, хотя тест на хи-квадрат не позволяет отклонить и вторую гипотезу о тетрасомном диплоидизированном механизме наследования. У белуги и стерляди в различных скрещиваниях наибольшая вероятность свойственна для тетрасомного диплоидизированного локуса во всех трех вариациях распределения гамет.

Afug112

Описан в литературе как дисомный локус у озерного осетра и не амплифицируемый у зеленого осетра. (табл. 2.5.).

В наших экспериментальных скрещиваниях на многохромосомных видах мы обнаружили не более двух аллелей на особь, причем с равным дозэффектом, что может говорить о полной диплоидизации этого локуса у таких видов как сибирский и русский осетры.

В скрещиваниях с участием малохромосомных видов – стерляди, белуги и севрюги между собой – локус ведет себя как обычный дисомный локус, подчиняющийся равновесию Харди-Вайнберга. Однако в одном из этих скрещиваний (самка стерляди на самца белуги) нами был обнаружен нуль-аллель, и на этом основании данный локус был исключен нами из потенциально возможных для исследования популяционной структуры сибирского осетра.

Локус AoxD234

Описан в литературе как дисомный локус для атлантического осетра (табл. 2.5.).

Таблица 3.6. Наследование аллелей в локусе Afug135в экспериментальных скрещиваниях

номер скрещ.	вид	пол	генотип	гаметы	набл.	ожд	ожд	ожд	ожд	модель	модель	модель	модель
						2x2n 1/2 3/4	2x2n 1/3 2/4	2x2n 1/4 2/3		4n	1 Chi ²	2 Chi ²	3 Chi ²
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
4	русский	самка	AABC	AA	1	0	2	2	1	0,000643	0,391625		0,881015
8 лич.				AB	2	4	2	2	3				
				AC	4	4	2	2	3				
				BC	1	0	2	2	1				
	русский	самец	DEFG	DE	3	0	2	2	1	5,68E-25	0,087396	0,001918	0,277662
				DF	1	2	0	2	1				
				DG	1	2	2	0	1				
				EF	1	2	2	0	2				
				EG	0	2	0	2	2				
				FG	2	0	2	2	2				
5	стерлядь	самка	AABC	AA	0	0	3	3	2	0,962692	0,001167		0,132205
14 лич.				AB	8	7	3	3	5				
				AC	6	7	4	4	5				
				BC	0	0	4	4	2				
	белуга	самец	ADEC	AD	4	0	3	3	2	5,36E-84	1,9E-07	0,969003	0,200864
				AE	2	4	0	3	2				
				AC	0	3	0	0	2				
				DE	0	3	3	0	2				
				DC	4	4	4	4	3				
				EC	5	0	4	4	3				
3	сибирский осетр4	самка	ABBC	AB	28	23	23	45	30	0,006798		0	0,600536
93 лич.				AC	10	22	22	0	15				
				BB	16	22	22	0	15				
				BC	30	22	22	45	30				

			ABBC	3									
	стерлядь5	самец	ADEF	AD	13	0	23	23	15	0	0,251406	0	2,8E-08
				AE	0	23	0	23	15				
				AF	27	23	23	0	15				
				DE	17	23	23	0	16				
				DF	0	23	0	23	16				
				EF	23	0	23	23	16				

Таблица 3.7. Наследование аллелей в локусе AoxD 234 в экспериментальных скрещиваниях.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
3	сибирский	самка	ABCD	AB	10	0	21	21	14	0	0	0	0,505109
93 лич.	осетр ⁴			AC	18	21	0	21	14				
				AD	14	21	21	0	14				
				BC	16	21	21	0	14				
				BD	18	22	0	21	15				
				CD	10	0	22	22	14				
				ABCD	8								
	Стерлядь ⁵	самец	EF	F	52								
				E	42								
4	русский	самка	ABCD	AB	2	0	2	2	1	5,72E-07	7,17E-09	7,17E-09	0,652311
8 лич.	осетр			AC	1	2	0	2	1				
				AD	1	2	2	0	2				
				BC	2	2	2	0	2				
				BD	2	2	0	2	1				
				CD	0	0	2	2	1				
	русский	самец	EFGG	EF	1	0	2	2	1	0,000815	0,572407		1,00
	осетр			EG	3	4	2	2	3				
				FG	3	4	2	2	3				
				GG	1	0	2	2	1				

При скрещивании малохромосомных видов проявляет себя как полиморфный дисомный локус. В таблице 3.7. представлено распределение аллелей в экспериментальных скрещиваниях на многохромосомных видах. Наибольшая вероятность распределения аллелей по тесту хи-квадрат характерна для тетрадного характера наследования. Нуль-аллели не были обнаружены. Также были зафиксированы потомки в скрещивании сибирского осетра и стерляди, несущие аномальное количество аллелей ($5n$) из-за нарушения в мейозе и нерасхождения генотипа самки (табл. 3.7.).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о возможном использовании этого локуса как для диплоидов, так и для тетраплоидов в популяционных исследованиях.

Afug 174

В литературе описан как тетрасомный локус для озёрного и зелёного осетров (табл. 2.5.), но в наших исследуемых скрещиваниях используемые производители были или полной гомозиготой или имели не более двух аллелей, поэтому сделать какой-либо вывод о механизмах наследования у многохромосомных видов, в частности, сибирского осетра нам не удалось. Но ясно, что полиморфность этого локуса явно недостаточна для использования его в панели локусов для планируемого популяционного исследования. В то же время для малохромосомных видов (белуга, севрюга, стерлядь) локус даёт распределение аллелей, характерное для кодоминантного менделевского наследования дисомного локуса, без отклонений от ХРВ, достаточно полиморфен и может быть использован для популяционных и филогенетических исследований.

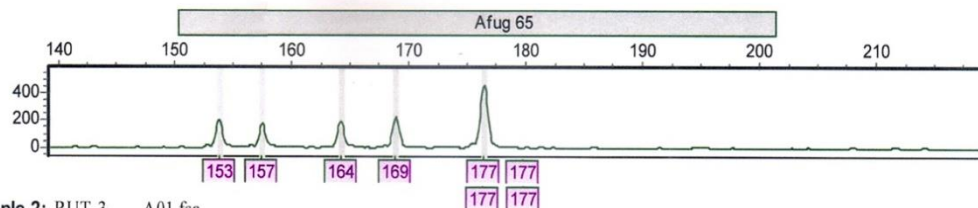
Локусы Afug 65, Afug 113, An40 и Ape32

В своей работе мы рассмотрели ещё четыре локуса, описанных для осетровых рыб (табл. 2.5.). Два из них – Afug65 и Afug113 – описаны как тетрасомные локусы для озёрного и зелёного осетров, An 40 описан как октаплоидный локус для адриатического осетра.

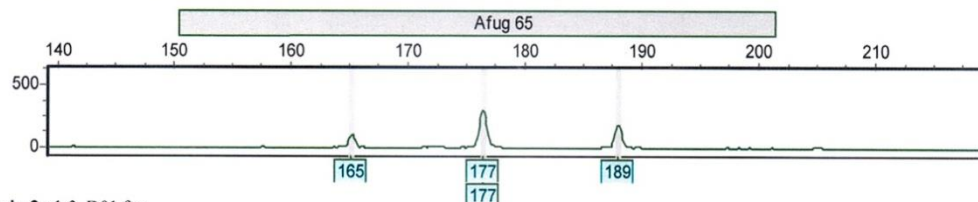
На наших экспериментальных скрещиваниях все эти локусы показали четкую октаплоидную картину наследования на русском и сибирском осетрах и тетрасомную на малохромосомных видах. Мы не будем приводить здесь подробные данные в связи с их громоздкостью, так как, например, в одном из скрещиваний потомки сибирских осетров несли до 70 различных гамет. Но проанализировав различные скрещивания, мы сделали вывод о том, что праймеры на локусы Afug 113 и An 40 поднимают два независимых тетрасомных диплоидизированных локуса у сибирского осетра, и два диплоидизированных локуса у малохромосомных видов.

Другие два локуса Afug 65 и Are 32 являются недиплоидизированными октаплоидными локусами, т.е. являются наиболее древними в эволюционном плане маркерами. К сожалению, статистический аппарат для обсчета таких данных и использовании их в популяционных исследованиях на сегодняшний день отсутствует, поэтому мы забраковали эти локусы для многохромосомных видов. Но для малохромосомных видов они являются хорошими, очень информативными маркерами, несущими в себе гораздо больше информации, чем диплоидные локусы, обычно используемые для этих видов. На рисунке 3.1. приведен пример амплификации локуса Afug 65 на скрещивании № 3 самки сибирского осетра на самца стерляди. Розовым цветом помечены аллели, характерные для самки, голубым – для самца. В аллеле 165 пн у самки произошла мутация и размер данного аллеля именно у этой особи 164 пн, благодаря чему мы можем различить у потомства, какой аллель пришел от самки, а какой от самца, так как их размер отличается на 1 пн. Полученное потомство – гексаплоиды, которые получили 4n от самки сибирского осетра (8n) и 2n от самца стерляди (4n). На рисунке 3.1. представлены четыре различных варианта генотипов полученного потомства.

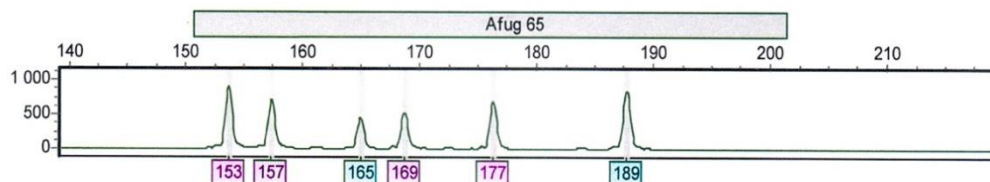
Sample 1: BAE-3 _B01.fsa



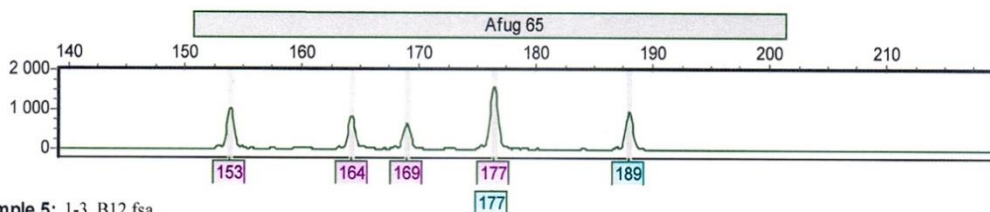
Sample 2: RUT-3 _A01.fsa



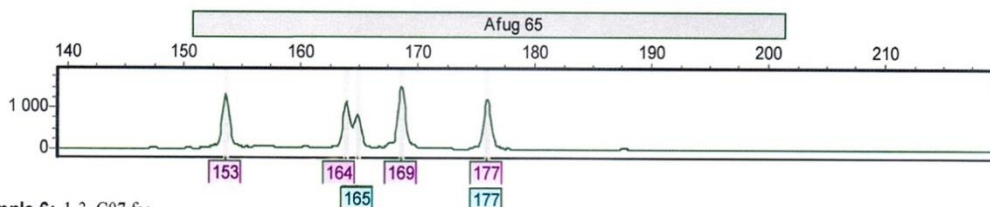
Sample 3: 1-3_D01.fsa



Sample 4: 1-3_C11.fsa



Sample 5: 1-3_B12.fsa



Sample 6: 1-3_C07.fsa

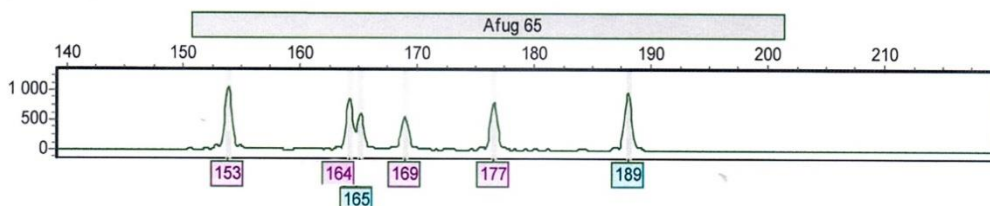


Рисунок 3.1. Пример амплификации локуса Afug 65 при скрещивании самки сибирского осетра (sample1) самцом стерляди (sample 2). Sample 3-6 – примеры генотипов полученного потомства.

Проанализировав экспериментальные скрещивания по 16 микросателлитным локусам, мы отобрали для работы только те локусы, которые:

1. имеют не более $4n$ генотип для сибирского осетра;
2. не имеют нуль-аллелей;
3. имеют высокую воспроизводимость амплификации;
4. соответствуют равновесию Харди-Вайнберга;
5. имеют наибольший аллельный полиморфизм (высокая информативность локуса);
6. амплифицируются в мультиплексной ПЦР;
7. имеют тетрануклеотидный повтор.

В результате мы составили один мультиплекс, состоящий из пяти микросателлитных локусов: Afug 41, Afug51, AoxD 161, AoxD 165, An 20, несущих три различные флуоресцентные метки (рис. 3.2.).

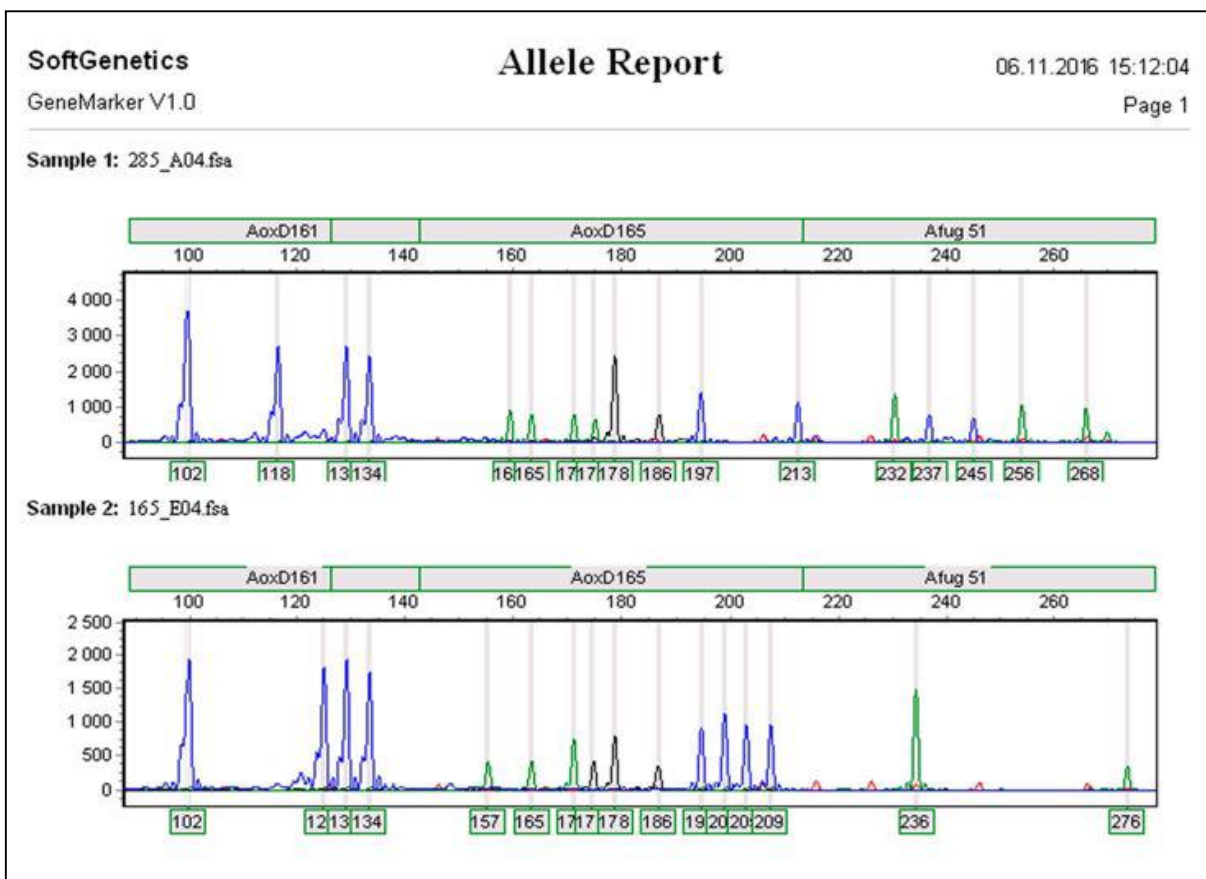


Рисунок 3.2. Пример амплификации мультиплекса по пяти микросателлитным локусам у двух особей сибирского осетра на приборе капиллярного электрофореза ABI 3130.

Данная панель микросателлитных локусов используется для генотипирования осетровых, в том числе с целью позитивной идентификации и осуществления прослеживаемости происхождения продукции в Научном органе СИТЕС в отношении осетровых видов рыб. Является основным инструментом в определении чистых видов и гибридов осетровых, внедрена и активно используется в трех молекулярно-генетических лабораториях, занимающихся генетикой осетровых в России. (в институтах ФГБНУ "АзНИИРх", ФГБНУ "КаспНИИРх", ФГБОУ ВО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья»).

3.2. МЕЖВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ СИБИРСКОГО ОСЕТРА И ДРУГИХ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

Проводящийся нами в течение последних десяти лет анализ полиморфизма по пяти представленным в настоящей работе микросателлитным локусам используется при генетической паспортизации аквакультурных стад осетровых и верификации легального происхождения икры от аквакультурных особей, а также производителей в искусственном воспроизводстве естественных популяций, что позволило накопить обширный материал по характеру аллельного состава и полиморфизму этих локусов.

3.2.1. Идентификация видоспецифичных аллелей

Все исследованные локусы оказались полиморфными у всех изучаемых видов (количество аллелей на локус варьирует от 2 до 29 в зависимости от вида и локуса (таблица 3.8.). Исключение составляет локус Afug41 для калуги - амплификация по данному локусу не идет. Максимальное количество аллелей на особь у многохромосомных видов для всех локусов составляет 4 аллеля, у малохромосомных – 2.

Таблица 3.8. Характеристика микросателлитных локусов для различных видов осетровых рыб.

Вид	Афуг41				Ан20				АоxD161				Афуг51				АоxD165				
	Кол-во аллелей на локус	диапазон (размер), пн	ср. кол-во аллелей на особь	Ожидаемая гетерозиг.	Кол-во аллелей на локус	диапазон (размер), пн	ср. кол-во аллелей на особь	Ожидаемая гетерозиг.	Кол-во аллелей на локус	диапазон (размер), пн	ср. кол-во аллелей на особь	Ожидаемая гетерозиг.	Кол-во аллелей на локус	диапазон (размер), пн	ср. кол-во аллелей на особь	Ожидаемая гетерозиг.	Кол-во аллелей на локус	диапазон (размер), пн	ср. кол-во аллелей на особь	Ожидаемая гетерозиг.	Ср. гетерозиготность по всем локусам
GUE	24	265-173	3,4	0,99	17	193-129	2,8	0,98	15	146-86	3,1	0,99	26	296-204	2,6	0,99	29	212-140	2,9	0,97	0,98
BAE	16	249-181	3,2	0,99	12	189-145	2,8	0,98	10	146-102	3,3	0,99	20	312-232	2,3	0,98	23	212-168	2,7	0,96	0,98
PER	21	261-173	3,2	0,99	13	185-137	2,5	0,96	12	154-102	3,2	0,99	17	288-212	2,6	0,98	19	206-150	2,6	0,92	0,97
SCH	9	225-185	3,1	0,99	8	173-133	1,6	0,59	10	142-106	3,1	0,99	8	296-208	2,6	0,87	12	216-164	3,2	0,99	0,89
MIK	8	225-185	2,4	0,99	7	197-161	2,2	0,98	4	126-114	2,1	0,87	2	296-288	1,3	0,25	15	254-182	3	0,98	0,81
DAU	-	-	-	-	3	169-149	2,2	0,93	9	146-114	3,1	0,98	5	252-228	2,0	0,76	12	218-174	3,1	0,99	0,92
HUS	20	285-201	1,8	0,87	12	181-137	1,6	0,58	6	122-98	1,2	0,33	8	296-244	1,5	0,62	10	200-170	1,4	0,34	0,55
RUT	16	257-197	1,8	0,89	11	181-141	1,7	0,76	10	138-102	1,8	0,83	9	276-236	1,4	0,46	17	204-164	1,8	0,84	0,76
NUD	10	253-201	1,8	0,76	4	165-149	1,5	0,56	8	142-114	1,9	0,82	4	272-256	1,6	0,66	8	216-168	1,8	0,74	0,71
STE	15	241-177	1,9	0,88	14	189-129	1,5	0,55	10	142-106	1,8	0,8	12	296-252	1,5	0,57	26	214-148	1,8	0,94	0,75

Расшифровка трехбуквенных символов осетровых видов рыб приведена в тексте

Размерный состав и частоты аллелей по видам для локусов An20 и AoxD161 представлены в таблице 3.9., для Afug51 и AoxD165 – в таблице 3.10. и локуса Afug 41- в таблице 3.11. В таблицах отражены аллели, имеющие частоту более 1%.

Наиболее информативным является локус An20, имеющий видоспецифичные аллели для семи видов осетровых.

Таблица 3.9. Встречаемость аллелей локусов An20 и AoxD161 у разных видов осетровых рыб.

		An20																
		197	193	189	185	181	177	173	169	165	161	157	153	149	145	141	137	129
BAE					0,01			0,04	0,23	0,15	0,31	0,15	0,01	0,03	0,05			
DAU									0,50	0,30				0,20				
HUS							0,02	0,04		0,02	0,04		0,02	0,59	0,26			
NUD										0,17	0,21		0,61	0,01				
RUT					0,02	0,42	0,02	0,12	0,08	0,18	0,06	0,08	0,02					
GUE					0,01	0,06	0,33	0,09	0,32	0,07	0,04	0,02	0,01	0,03			0,01	
MED	0,06	0,27	0,03	0,12	0,19			0,01		0,31								
PER					0,05	0,07	0,43	0,05	0,29	0,09								
SCH							0,03	0,01		0,06		0,04	0,04				0,80	
STE					0,04	0,02		0,03		0,01				0,24	0,62	0,02	0,05	

		AoxD161												
		146	142	138	134	130	126	122	118	114	110	106	102	98
BAE	0,02				0,14	0,12	0,13	0,22	0,01	0,01	0,26	0,02	0,08	
DAU		0,04	0,11	0,14			0,18	0,39	0,14					
HUS												0,01	0,12	0,87
NUD		0,05	0,23	0,23	0,15	0,02	0,03	0,22	0,06					
RUT			0,04	0,08	0,04	0,04	0,12	0,05	0,04	0,12	0,14	0,33		
GUE			0,05	0,13	0,22	0,21	0,14	0,11	0,03	0,03	0,01	0,08		
MED						0,01	0,26	0,12	0,60					
PER		0,01	0,02	0,11	0,22	0,18	0,11	0,18	0,03	0,05	0,04	0,06		
SCH		0,05	0,03	0,03	0,03	0,10	0,23	0,03	0,15	0,33	0,03			
STE		0,01	0,09	0,07	0,08	0,23	0,19	0,31	0,02					

Жирным шрифтом выделены частоты аллели, позволяющие проводить видовую идентификацию и обсуждаемые в тексте

Таблица 3.10. Встречаемость аллелей локусов Afug51 и AoxD165 у разных видов осетровых рыб
Afug51

	300	296	292	288	284	280	276	272	268	264	260	256	252	248	244	240	236	232	228	224	212	208
BAE	0,04	0,02	0,04		0,34	0,02	0,06	0,05	0,02	0,03	0,25	0,07	0,03					0,01				
DAU													0,25			0,10	0,25	0,30	0,1			
HUS										0,35	0,49	0,14			0,02							
NUD								0,43		0,27	0,30	0,01										
RUT										0,04	0,01	0,01	0,71	0,19	0,04							
GUE			0,01		0,04		0,08	0,02	0,04	0,04		0,08	0,04	0,02	0,02	0,10	0,14	0,31		0,04		0,01
MIK		0,93		0,07																		
PER									0,02	0,02		0,01	0,01			0,15	0,16	0,35		0,25	0,01	
SCH		0,05							0,04	0,09		0,08	0,08				0,60	0,04				0,01
STE			0,11	0,63	0,09	0,10	0,01	0,01	0,01			0,03										

AoxD165

	254	242	238	234	230	216	212	210	208	206	204	202	200	198	196	194	192	190	188	186	184	182	180	178	176	174	172	170	168	164	156	152	148	
BAE									0,02		0,04		0,07		0,20		0,04		0,08		0,04		0,42	0,04*	0,03									
DAU						0,02		0,11		0,28		0,06		0,15		0,03		0,04		0,17						0,13								
HUS																						0,18		0,79		0,01								
NUD							0,03			0,03		0,26			0,40							0,14		0,05					0,11					
RUT															0,03		0,03		0,07	0,01	0,21	0,02	0,28		0,16		0,07		0,07	0,01				
GUE											0,02		0,03	0,03	0,06	0,01	0,05	0,03	0,09	0,03	0,06			0,41	0,03	0,10								
MIK	0,06	0,01	0,13	0,39	0,05			0,11						0,05				0,02	0,02	0,11		0,01												
PER											0,04		0,10		0,04		0,10	0,01	0,08	0,01	0,09	0,01	0,54	0,02	0,05						0,03			
SCH									0,04		0,03		0,02		0,07		0,17		0,10		0,09			0,17		0,15		0,15						
STE								0,01		0,01	0,07	0,02	0,03	0,01	0,05	0,04	0,04	0,04	0,11	0,10	0,09	0,11	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,03				0,07	0,03	

* В некоторых аквакультурных стадах сибирского осетра, полученных от единичных производителей, нами наблюдалась значительно более высокая встречаемость этого аллеля.

Таблица 3.11. Встречаемость аллелей локуса Afug41 у разных видов осетровых рыб

вид	277	269	265	261	257	253	249	245	241	237	233	229	225	221	217	213	209	205	201	197	193	189	185	173
BAE							0,01	0,05	0,04	0,02	0,07	0,04	0,24	0,04	0,15	0,03	0,12	0,02		0,17				
DAU																								
HUS	0,02	0,02	0,05	0,01	0,05	0,06	0,07	0,22	0,08	0,19	0,14	0,04	0,03											
NUD						0,02	0,04	0,35	0,07	0,30	0,02	0,08				0,01			0,10					
RUT						0,01	0,01	0,04	0,11	0,11	0,08	0,19	0,14	0,10	0,09	0,04	0,03	0,04	0,01	0,05				
GUE							0,01	0,02	0,03	0,05	0,04	0,06	0,06	0,05	0,06	0,09	0,12	0,08	0,11	0,15	0,03			0,02
MIK													0,06		0,04	0,01		0,07	0,19	0,57	0,03			
PER									0,01	0,03	0,01	0,01		0,04	0,04	0,11	0,11	0,08	0,20	0,28	0,01			0,03
SCH																0,03	0,04	0,02	0,03	0,23	0,18	0,20	0,27	
STE											0,06	0,05	0,07	0,09	0,07	0,17	0,10	0,14	0,05	0,19	0,03			

Для сахалинского осетра (MIK) по локусу Afug41 специфичным является аллель 197 (здесь и далее обозначение аллеля приводится по длине амплифицированного фрагмента, выраженной в парах нуклеотидов), а по локусу Afug 51 - аллель 296. Частота более 90% означает, что хотя бы одна копия этого аллеля в тетраплоидном сахалинском осетре присутствует практически у всех (99,995%) особей. По локусу AoxD161 аллель 114 также встречается практически у всех проанализированных особей. По локусу AoxD165 аллели в диапазоне 254-230, а по локусу An20 аллели 197- 185 характерны только для этого вида.

Для шипа (NUD) характерен аллель 153 в локусе An20, аллель 272 в локусе Afug51, а по локусу AoxD165 у 74% особей шипа встречается аллель 196.

Стерлядь (RUT) определяется по аллелю 177 локуса An 20 (присутствует у более 80% особей) и незначительно встречается у других видов (менее 7%); по локусу Afug51 - определяющий аллель 252, который встречается и у калуги, но эти виды легко отличаются по разной ploидности, также как и сибирский осетр, несущий аллель 180 по локусу AoxD165, который присутствует и у половины особей стерляди.

Для калуги (DAU) отсутствие амплификации по локусу Afug 41 может служить четким видоспецифичным маркером на данный вид осетровых рыб, а также только у этого вида встречается аллель 206 по локусу AoxD165, а аллель 169 локуса An20 встречается у 93% особей (частота аллеля – около 50%).

Для белуги (HUS) по локусу An20 - определяющие аллели 149 и 145, причем аллель 149 характерен в меньшей степени и калуге (которой присуща более высокая ploидность) и здесь для точной идентификации необходимо использование нескольких локусов, имеющих специфичные для белуги аллели, например локус AoxD161. По этому локусу практически все особи (98%) несут аллель 98, который не характерен для других видов (у русского и персидского осетров - менее 1%). В российских аквакультурных хозяйствах под видом шипа

часто встречается гибрид белуги на шипа, который легко определяется именно по этому аллелю и имеет митохондриальный гаплотип белуги. По локусу AoxD165 96% особей белуги несут аллель 178, этот аллель в подавляющем количестве несут и тетраплоидные, в отличие от белуги, русский и персидский осетры. В конце диапазона локуса Afug41 располагаются аллели, характерные только для белуги, хотя частота этих аллелей невелика (249-277).

Для **севрюги (STE)** аллель 141 локуса An20 встречается у 85 % особей, а по локусу Afug51 аллель 288 четко указывает на этот вид.

Для **амурского осетра (SCH)** характерен аллель 137 локуса An20, причем этот аллель встречается у 100 процентов особей. В начале размерного диапазона локуса Afug41 несколько аллелей встречаются преимущественно в амурском осетре (аллели 197, 193, 189, 185) и 99% особей будут нести хотя бы один из этих аллелей, которые могут служить генетическим маркером вида.

Для **русского (GUE), персидского (PER) и сибирского (BAE) осетров** не найдены четкие аллельные маркеры. Можно заметить, что по локусу Afug51 вклад 232 аллеля для русского и персидского осетров более 30%, т.е. он встречается примерно у 75% особей этих видов, при этом 224 аллель встречается у более 65% персидского осетра, а у русского только у 15%. По локусу AoxD165 178 аллель в подавляющем большинстве несут и русский и персидский осетр, а у сибирского осетра мажорным является аллель 180. Это нельзя назвать видоспецифичными аллелями, но некоторая детерминация этих видов явно прослеживается. Следует отметить, что в некоторых аквакультурных стадах сибирского осетра, полученных от единичных производителей, нами наблюдалась значительно более высокая встречаемость аллеля 178, что вероятно обусловлено эффектом основателя. Таким образом, использование аллелей 180 и 178 для идентификации русского, сибирского осетров и их гибрида представляется нецелесообразным.

Аллели по всем локусам, информативные при видовой идентификации особей, представлены в таблице 3.12.

Таблица 3.12. Видоспецифичные аллели исследованных STR-локусов для осетровых видов рыб, пригодные для видовой идентификации, а также установление происхождения гибридных особей по отцовской линии.

Вид	STR-локус	размер аллеля, пн.
Сахалинский осетр (MED)	An20	181,185,189,193,197
	Afug51	296
	AoxD161	114
	AoxD165	230, 234, 238, 242, 254
Шип (NUD)	An20	153
	Afug51	272
	AoxD165	196
Стерлядь (RUT)	An20	177
	Afug51	252
Калуга (DAU)	AoxD165	206
	Afug41	не амплифицируется
	An20	169
Белуга (HUS)	An20	145, 149
	AoxD161	98
	AoxD165	178
	Afug41	277,269,265,262,257,253
Севрюга (STE)	An20	141
	Afug51	288
Амурский осетр (SCH)	An20	137
	Afug41	193,189,185

3.2.2. Определение видовой принадлежности осетровых (assignment test) с использованием полиморфизма микросателлитных локусов

Для оценки применимости анализируемых микросателлитных локусов, нами был проведен анализ принадлежности к группировке (assignment test), реализованный в программе STRUCTURE с использованием параметра К в соответствии с числом анализируемых видов (К=4 для малохромосомных видов, и К=6 для многохромосомных видов). Поскольку все исследованные нами в данной работе микросателлитные локусы у малохромосомных видов имели диплоидный характер наследования, а многохромосомные –

тетраплоидный, в программе STRUCTURE параметр ploidy был указан как diploid и tetraploid соответственно. В связи с разным параметром ploidy, сравнение диплоидной (рис.3.3.) и тетраплоидной (рис.3.4.) групп осетровых проводилось отдельно.

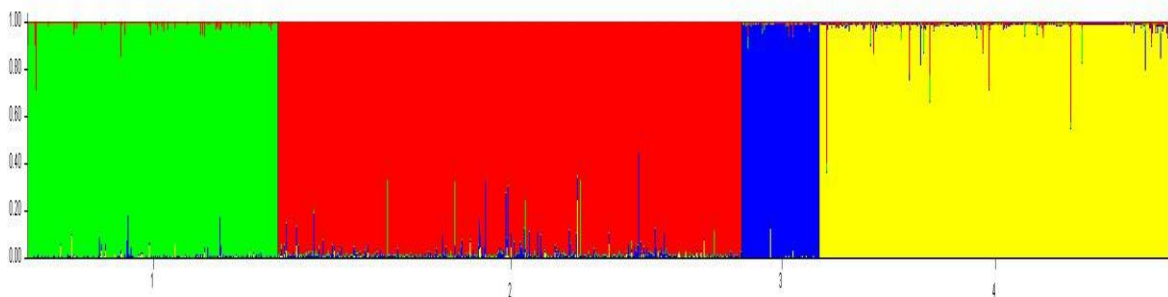


Рисунок 3.3. Выделение отдельных видов 2n-осетровых в кластеры (STRUCTURE, diploid, K=4). По оси X: 1 – севрюга (зеленый цвет), 2- стерлядь (красный цвет), 3 – шип (синий цвет), 4 – белуга (желтый цвет).

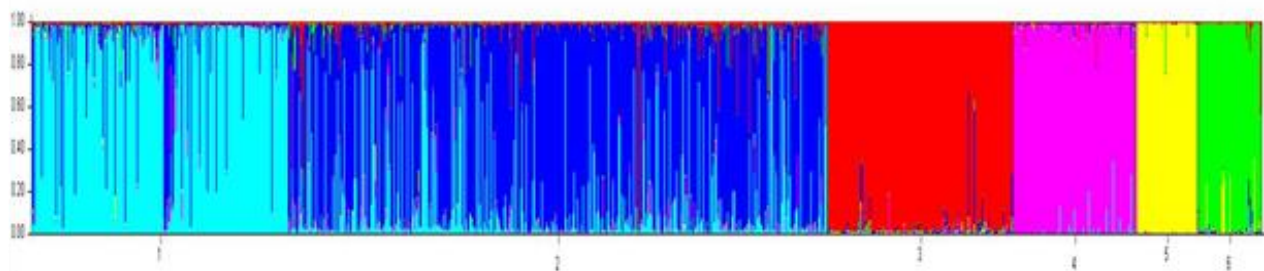


Рисунок 3.4. Выделение отдельных видов 4n-осетровых в кластеры (STRUCTURE, tetraploid, K=6). По оси X: 1 – персидский осетр (голубой цвет), 2– русский осетр (синий), 3- сибирский осетр (красный), 4 – калуга (розовый), 5 - сахалинский осетр (желтый), 6 – амурский осетр (зеленый).

Ожидаемая гетерозиготность (H_0) по всем 5 локусам приведена в таблице 3.10. и ее значения достаточно высоки, особенно для многохромосомных видов, и только у белуги, как наиболее мономорфного вида значение H_0 значительно меньше – 0,55. Проведенный «assignment test» показал, что каждому виду соответствует свой отдельный кластер, и только кластеры русского и персидского осетров пересекаются друг с другом. Вероятность принадлежности отдельных особей к виду для амурского, сахалинского, сибирского осетров и калуги достаточно высока, не ниже 93% (табл.3.13.), а вот для персидского и русского осетров вероятность составляет 84% и 75% соответственно.

Максимальная принадлежность для большинства особей составляет 99%, а минимальная, например, для сибирского осетра около 35%, но таких только две особи и на 65% они приписываются к кластеру русского осетра, возможно, имеют гибридное происхождение.

Кластеры русского и персидского осетров не имеют четкой границы, некоторые особи (до 18%) ложатся в кластер другого вида, что не позволяет провести видовую диагностику по данной микросателлитной панели.

Таблица 3.13. Пропорциональный состав исследованных выборок в сгенерированных кластерах. Число кластеров соответствует числу выборок.

Вид	PER	GUE	BAE	DAU	MED	SCH
PER	0,835	0,134	0,006	0,014	0,005	0,007
GUE	0,182	0,751	0,033	0,018	0,004	0,011
BAE	0,006	0,02	0,959	0,007	0,004	0,004
DAU	0,018	0,008	0,008	0,96	0,003	0,004
MED	0,002	0,002	0,003	0,003	0,981	0,008
SCH	0,007	0,01	0,016	0,005	0,032	0,931

Вероятность принадлежности отдельных особей к виду в малохромосомной выборке в среднем составляет чуть больше 98% (для шипа) или чуть меньше для всех остальных. Максимальная вероятность для всех видов составляет 0,99, и большинство особей имеют вероятность принадлежности к своему кластеру 0,99-0,96. Однако минимальные значения единичных особей значительно ниже – шип (0,87), севрюга (0,70), стерлядь (0,55), белуга (0,36). Причем особь стерляди с низкой вероятностью принадлежности к своему кластеру приписывается к кластеру шипа, а особи белуги – к севрюжьему кластеру.

Проведение анализа по пяти микросателлитным локусам позволяет определить не только генетический профиль особи, но и установить вид, а также выявить особь гибридного происхождения. В последнем случае, анализ мтДНК позволяет определить видовую принадлежность гибрида по

материнской линии, а происхождение гибрида по отцовской линии определяется присутствием у гибрида аллелей, не характерных для материнского вида.

Так, анализ морфологически уклоняющейся особи из природной популяции Азовского моря, проведенный нами с использованием представленной панели, позволил идентифицировать как триплоидную особь гибридного происхождения (русский осетр x белуга) (Nebesikhina et al., 2012).

Особое значение своевременное выявление гибридных особей приобретает при анализе ремонтно-маточных стад на осетровых рыбоводных заводах (ОРЗ). Катастрофическое снижение численности идущих на нерест диких производителей заставляет практически все ОРЗ использовать для получения молоди половые продукты доместигированных, а иногда и полученных «от икры» аквакультурных рыб. Своевременная выбраковка гибридных особей (как среди выловленных из природы, так и среди аквакультурных) необходима для поддержания генетической целостности природной популяции восстанавливаемых видов. Для сибирского осетра достаточно часто стали выявляться в исследуемых маточных стадах гибриды с русским осетром и стерлядью, а на Дальнем Востоке с амурским осетром, так как они активно используются в товарном осетроводстве.

Разработанная тест-система по выявлению гибридных особей на основе вышеописанной панели микросателлитных локусов используется для экспертизы соответствия продукции из осетровых (икра, балык и др.) маркировке и сопроводительным документам, в том числе и для проведения судебных и криминалистических экспертиз по запросам правоохранительных органов. Диагностика гибридного происхождения очень важна при выявлении нелегальной продукции из Китая, где огромный объем продукции имеет именно гибридное происхождение.

3.3. ПРИРОДНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ СИБИРСКОГО ОСЕТРА И ФИЛОГЕОГРАФИЯ

3.3.1. Исследование митохондриальной ДНК

Нами исследованы последовательности контрольного региона мтДНК длиной 685 п.н. Всего у 151 особи сибирского осетра из 5 популяций выявлено 50 различных митохондриальных гаплотипов (депонированы в GenBank NCBI под номерами KU375049-KU375098), из которых 7 являются общими для разных популяций (представлены в двух – пяти популяциях), остальные представлены только в одной. Распределение гаплотипов по популяциям показано в таблице 3.14.

Таблица 3.14. Распределение выявленных гаплотипов сибирского осетра в исследованных природных популяциях

№	НАР	Популяция	Количество, экз.
1	ВаеН1	обско-иртышская	1
2	ВаеН2	енисейская	1
3	ВаеН3	ленская	11
		байкальская	2
4	ВаеН4	обско-иртышская	5
		байкальская	2
5	ВаеН5	обско-иртышская	9
		енисейская	4
		байкальская	1
6	ВаеН6	ленская	1
7	ВаеН7	байкальская	2
		ленская	14
		обско-иртышская	3
		колымская	4
		енисейская	6
8	ВаеН8	байкальская	2
9	ВаеН9	обско-иртышская	1
10	ВаеН10	обско-иртышская	1
11	ВаеН11	ленская	1
12	ВаеН12	енисейская	2
13	ВаеН13	обско-иртышская	1

14	ВаеН14	ленская	1
15	ВаеН15	ленская	1
16	ВаеН16	обско-иртышская	1
17	ВаеН17	ленская	3
18	ВаеН18	обско-иртышская	1
19	ВаеН19	ленская	1
20	ВаеН20	ленская	1
21	ВаеН21	ленская	1
22	ВаеН22	обско-иртышская	1
23	ВаеН24	енисейская	1
24	ВаеН25	ленская	2
25	ВаеН26	ленская	1
26	ВаеН29	байкальская	1
27	ВаеН30	обско-иртышская	1
28	ВаеН31	байкальская	1
29	ВаеН32	байкальская	4
		енисейская	4
30	ВаеН33	байкальская	1
31	ВаеН34	байкальская	1
32	ВаеН35	байкальская	4
		обско-иртышская	1
33	ВаеН36	колымская	17
		обско-иртышская	2
		байкальская	1
34	ВаеН37	обско-иртышская	1
35	ВаеН38	байкальская	1
36	ВаеН39	байкальская	1
37	ВаеН40	обско-иртышская	1
38	ВаеН42	енисейская	1
39	ВаеН43	ленская	1
40	ВаеН44	обско-иртышская	1
41	ВаеН45	обско-иртышская	1
42	ВаеН47	обско-иртышская	2
43	ВаеН48	обско-иртышская	1
44	ВаеН49	ленская	7
45	ВаеН50	ленская	1
46	ВаеН51	обско-иртышская	1
47	ВаеН52	енисейская	1
48	ВаеН53	обско-иртышская	1
49	ВаеН54	ленская	1
50	ВаеН55	обско-иртышская	1

На основании полученных данных была построена сеть гаплотипного разнообразия популяций сибирского осетра (рис. 3.5.).

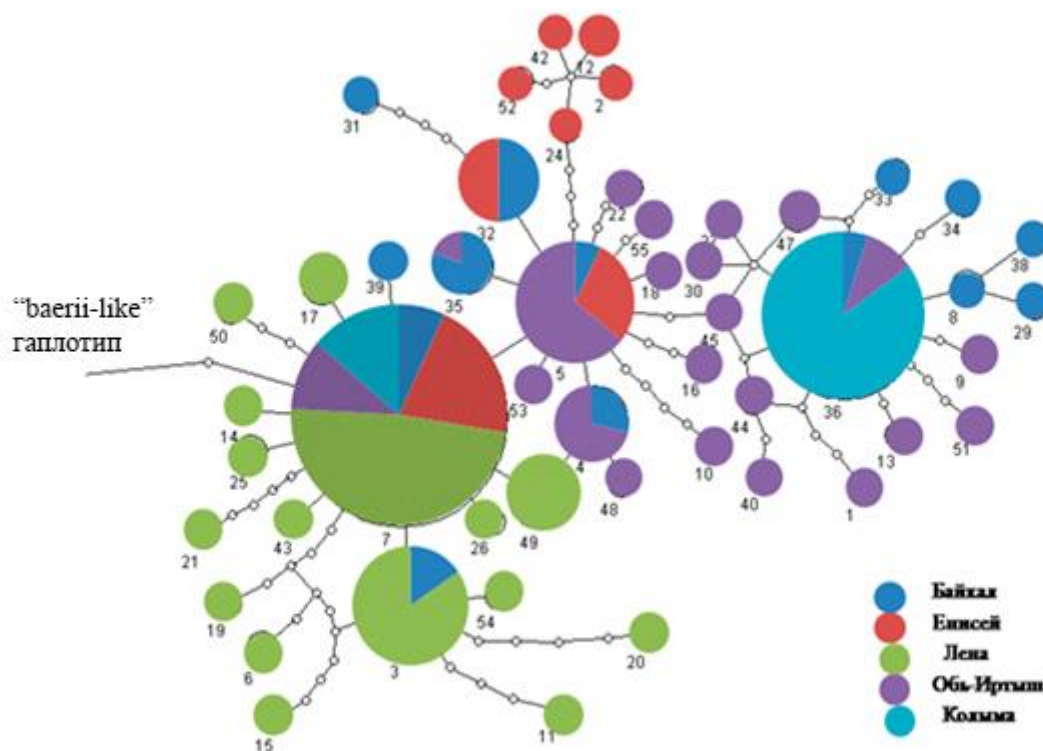


Рисунок 3.5. Сеть гаплотипов исследованных выборок пяти природных популяций сибирского осетра (р. Лена -зеленый цвет; оз. Байкал – синий цвет; р. Колыма – голубой цвет; р. Енисей – бордовый; р. Обь – фиолетовый). Ветвь, обозначенная “*baerii-like*”, направлена к одноименному кластеру гаплотипов русского осетра *A. gueldenstaedtii* каспийской популяции (на рисунке не представлены).

В Обь-Иртышской популяции выявлено 27 гаплотипов (22 уникальных и пять общих с другими популяциями). Енисейская популяция характеризуется 11 гаплотипами - 8 уникальных, а также представлена в 3-х общих гаплотипах. Ленская популяция характеризуется 16 гаплотипами, из них 14 уникальных, а также имеет долю в 2-х общих гаплотипах. Колымская популяция представлена только двумя гаплотипами и оба являются общими для других популяций. В

байкальской популяции выявлено 14 мт гаплотипов, из которых 7 уникальны для данной популяции. Также байкальские гаплотипы представлены во всех семи гаплотипах, являющихся общими в 2 и более популяциях сибирского осетра, что позволяет предположить историческую связь современной популяции озера Байкал со всеми исследованными нами популяциями.

В Обь-Иртышской и Байкальской популяциях наблюдается наибольшее гаплотипное и нуклеотидное разнообразие, наименьшие значения выявлены в популяции реки Колыма (таб. 3.15.). Анализ дифференциации исследованных популяций сибирского осетра показал, что все популяции значимо отличаются друг от друга по критерию F_{ST} за исключением Обь-Иртышской и Байкальской популяции (таб. 3.16.).

Таблица 3.15. Характеристика гаплотипного и нуклеотидного разнообразия исследованных популяций сибирского осетра

	Обь-Иртыш	Енисей	Байкал	Лена	Колыма
Количество особей	38	20	24	48	21
Количество мт-гаплотипов	22	8	14	16	2
Кол-во полиморфных сайтов	38	12	18	32	3
Гаплотипное разнообразие(H) (%)	92.75 ±2.95	85.26 ±4.90	94.2 ±2.74	84.84 ±3.29	32.38 ±10.82
Нуклеотидное разнообразие(π) (%)	0.59 ±0.34	0.5 ±0.3	0.61 ±0.35	0.36 ±0.22	0.14 ±0.11

Таблица 3.16. Значения генетических дистанций (F_{ST} , над диагональю), среднее число замен между гаплотипами внутри популяции (P_iX , диагональ) и скорректированное среднее число нуклеотидных замен ($(P_iXY - (P_iX + P_iY)/2)$, под диагональю) между исследованными природными популяциями сибирского осетра по данным анализа мтДНК.

	Обь-Иртыш	Енисей	Байкал	Лена	Колыма
Обь-Иртыш	3.935	0.142(***)	0.013(NS)	0.208(***)	0.289(***)
Енисей	0.625	3.300	0.128(***)	0.197(***)	0.537(***)
Байкал	0.053	0.545	4.011	0.176(***)	0.290(***)
Лена	0.803	0.637	0.606	2.393	0.511(***)
Колыма	1.211	2.443	1.070	2.080	0.971

NS – статистическая значимость отсутствует, *** - статистическая значимость при $p < 0,001$

Попарные межгаплотипные дистанции также свидетельствуют о пониженном генетическом разнообразии популяции р. Колымы (среднее число замен между гаплотипами внутри популяции $P_iX = 0.97143$), в то время как наибольшее значение дистанций между гаплотипами в популяции оз. Байкал ($P_iX = 4.011$). Полиморфные нуклеотидные сайты фрагмента контрольного региона мтДНК сибирского осетра представлены в таблице 3.17.

3.3.2. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов

Все используемые локусы показали высокую полиморфность для исследуемых популяций сибирского осетра. Количество выявленных аллелей для каждого локуса и количество аллелей на особь указано в таблице 3.18.

Таблица 3.18. Характеристика аллельного разнообразия исследованных локусов среди популяций сибирского осетра

	An20		AoxD165		Afug41		Afug51		AoxD161	
	Кол-во аллелей на локус	Кол-во аллелей на особь	Кол-во аллелей на локус	Кол-во аллелей на особь	Кол-во аллелей на локус	Кол-во аллелей на особь	Кол-во аллелей на локус	Кол-во аллелей на особь	Кол-во аллелей на локус	Кол-во аллелей на особь
Лена	9	3.08	8	2.27	11	3.31	5	2.05	9	3.40
Енисей	11	3.25	10	3.30	14	3.75	10	2.05	9	3.30
Байкал	11	3.10	8	3.04	9	3.09	6	2.90	8	3.45
Обь	7	2.94	12	3.16	6	3.23	4	2.60	8	2.90
Колыма	7	3.19	9	3.14	13	3.29	12	2.38	8	3.29
Все популяции	11	3.09	15	2.92	18	3.31	16	2.38	11	3.25

Исследование генетической структуры сибирского осетра с применением микросателлитных маркеров указывает на отсутствие мажорных диагностических аллелей, специфичных для какой-либо из природных популяций (таб. 3.19.).

В тоже время результаты assignment test, проведенного в программе Structure, указывают, что популяции имеют значимую дифференциацию между собой, хотя распределение выборок по группам не соответствует принятому делению этого вида на оз. Байкал и бассейны сибирских рек – Оби, Енисея, Лены и Колымы.

Таблица 3.19. Встречаемость аллелей пяти микросателлитных локусов в природных популяциях сибирского осетра

An20	145	149	153	157	161	165	169	173	177	181	185					
Общий	0.03	0.06	0.01	0.11	0.27	0.23	0.14	0.05	0.01	0.02	0.08					
Лена	0.01	0.06	0.01	0.16	0.35	0.12	0.24	0.05	0.00	0.00	0.01					
Енисей	0.05	0.03	0.02	0.23	0.10	0.10	0.15	0.13	0.03	0.03	0.12					
Байкал	0.01	0.03	0.04	0.07	0.19	0.36	0.14	0.06	0.03	0.06	0.01					
Обь	0.03	0	0	0.04	0.28	0.35	0.01	0.04	0	0	0.24					
Колыма	0.08	0.190	0	0.10	0.33	0.13	0.15	0.01	0	0	0					
AoxD161	102	106	110	114	118	122	126	130	134	138	146					
Общий	0.17	0.04	0.24	0.02	0	0.14	0.11	0.11	0.16	0	0.01					
Лена	0.09	0.01	0.24	0	0.01	0.21	0.20	0.09	0.11	0	0.03					
Енисей	0.10	0.13	0.23	0.02	0	0.03	0.07	0.22	0.18	0.02	0					
Байкал	0.22	0.05	0.21	0.05	0	0.08	0.09	0.19	0.10	0	0					
Обь	0.17	0.01	0.29	0.02	0	0.22	0.02	0.02	0.25	0	0					
Колыма	0.32	0.04	0.18	0	0	0.05	0.17	0.11	0.13	0	0.01					
AoxD165	168	172	174	176	178	180	182	184	188	192	196	200	204	206	208	
Общий	0	0	0.02	0.07	0.09	0.31	0	0.01	0.09	0.09	0.22	0.06	0.02	0	0	
Лена	0	0	0	0.02	0	0.55	0	0.04	0.11	0.02	0.23	0.03	0.01	0	0	
Енисей	0	0	0	0.05	0.10	0.37	0	0.02	0.10	0.18	0.08	0.05	0.03	0	0.02	
Байкал	0	0	0	0.20	0.10	0.34	0	0	0.11	0.08	0.06	0.05	0.05	0	0	
Обь	0.01	0.01	0	0.06	0.19	0.11	0.01	0	0.03	0.18	0.35	0.03	0.01	0	0.01	
Колыма	0	0	0.14	0	0.10	0.10	0	0	0.14	0.04	0.25	0.20	0.02	0.01	0	
Afug51	232	236	240	244	248	252	256	260	264	268	272	276	280	284	292	300
Общий	0.01	0	0.01	0	0.02	0.06	0.27	0.10	0.03	0.06	0.09	0.15	0	0.18	0.01	0
Лена	0	0	0	0	0	0	0	0.35	0	0	0	0.14	0	0.45	0.05	0.01
Енисей	0.02	0	0	0	0.02	0.15	0.18	0	0.10	0.05	0.25	0.17	0.03	0.03	0	0

Байкал	0	0	0	0	0.09	0.20	0.29	0	0.07	0	0.20	0.14	0	0	0	0		
Обь	0	0	0	0	0	0	0.59	0	0	0	0.05	0.18	0	0.18	0	0		
Колыма	0.04	0.01	0.04	0.01	0.02	0.01	0.25	0	0.01	0.38	0.10	0.12	0	0.01	0	0		
Afug41	173	197	201	205	209	213	217	221	225	229	233	237	241	245	249	253	257	261
Общий	0	0.17	0.01	0.01	0.14	0.03	0.09	0.06	0.18	0.13	0.08	0.06	0.02	0.02	0	0	0	0
Лена	0	0.20	0.00	0.01	0.14	0.01	0.19	0.04	0.28	0.01	0.02	0.00	0.06	0.04	0	0	0	0
Енисей	0.03	0.05	0.07	0.07	0.13	0.12	0.05	0.00	0.15	0.08	0.07	0.10	0.03	0.03	0.02	0	0	0
Байкал	0	0.15	0	0	0.10	0.05	0.11	0.19	0.18	0.06	0.10	0.06	0	0	0	0	0	0
Обь	0	0.14	0	0	0.14	0	0	0	0.05	0.40	0.16	0.10	0	0	0	0	0	0
Колыма	0	0.26	0	0	0.15	0.04	0.10	0.05	0.21	0	0.04	0.07	0.02	0	0.01	0.01	0.01	0.02

*цветом выделена частота аллеля в популяции равно или более 20 процентов.

При проведении кластерного анализа с параметрами (no admixture, no priors) при $k=3$ (рис. 3.9 а.) четко обособленные популяционные кластеры образуют ленская и объ-иртышская популяции, а популяции Енисея, Байкала и Колымы объединяются в единый кластер.

При увеличении числа кластеров ($k=4$ и $k=5$) в отдельный кластер обособляется популяция р. Колымы, а среди особей из популяций р. Енисей и оз. Байкал начинают выделяться два кластера, не соответствующих популяционной принадлежности (рис.3.9 б, 3.9 в). Таким образом, популяции из Енисея и Байкала не разделяются между собой ни при каких значениях k . Анализ только двух выборок (Енисей и Байкал) при различных k не приводит к разделению на кластеры, соответствующие популяционной принадлежности (данные не представлены), что говорит о недостаточной генетической дифференциации популяций Байкала и Енисея.

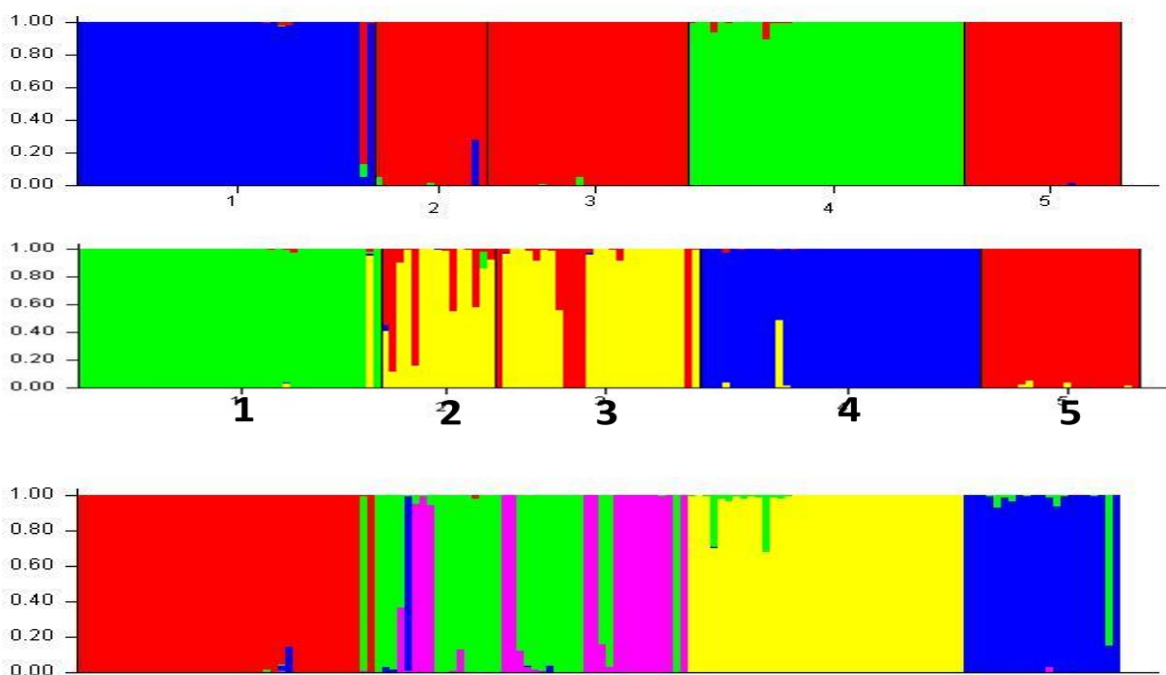


Рисунок 3.9. Кластерный анализ, проведенный в программе Structure (1- популяция р. Лена; 2- популяция р. Енисей; 3- популяция оз. Байкал; 4-Обь-Иртышская популяция; 5- популяция р. Колыма) а) при $k=3$; б) при $k=4$; в) при $k=5$.

Значение F_{ST} по данным микросателлитного анализа варьируют от 0.012 между популяциями Байкала и Енисея до 0.064 между популяциями Оби и Лены (таб. 3.20.).

Таблица 3.20. Значения генетических дистанций (F_{ST}) между исследованными природными популяциями сибирского осетра по данным микросателлитного анализа

Fst	Лена	Енисей	Байкал	Обь	Колыма
Лена		***	***	***	***
Енисей	0.037		NS	***	***
Байкал	0.043	0.012		***	***
Обь	0.064	0.034	0.040		***
Колыма	0.048	0.032	0.030	0.043	

Анализ главных координат по результатам значений F_{ST} исследованных выборок сибирского осетра представлен на рисунке 3.9. Популяции Байкала и Енисея практически неотличимы, в то время как популяции Обь-Иртышского бассейна и Лены разнесены в пространстве первой и второй (рис.3.10 а), а популяция р. Колымы четко обособляется в пространстве первой и третьей (рис.3.10 б) координат.

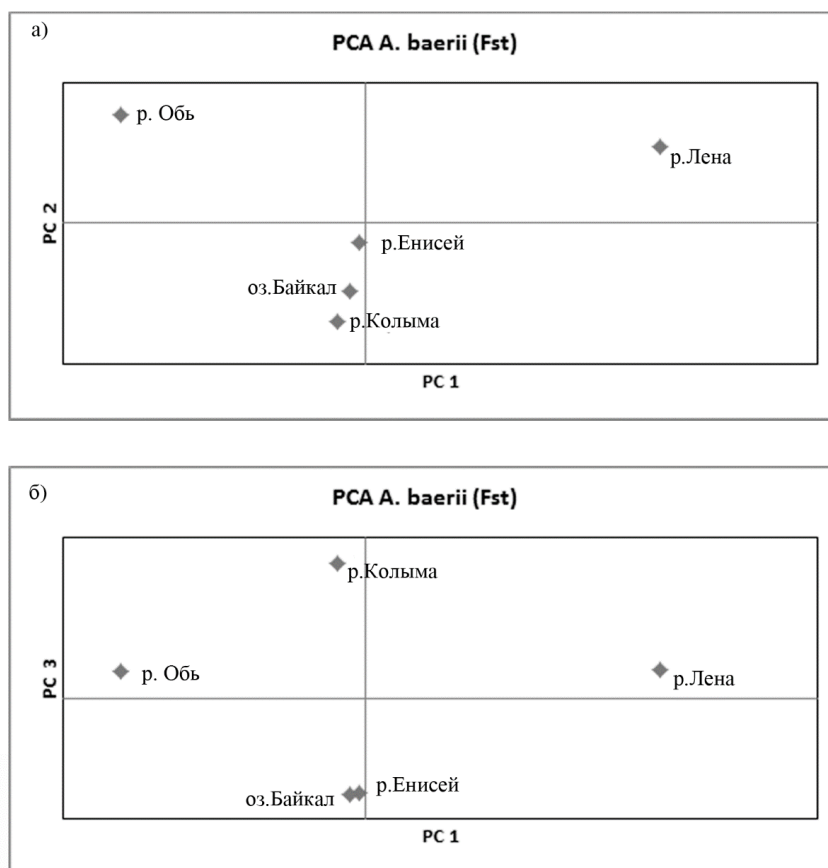


Рисунок 3.10. Анализ главных координат (PCoA) исследованных выборок сибирского осетра по данным микросателлитного анализа по первой и второй (а) и первой и третьей (б) главным координатам. Вклад 1-й, 2-й и 3-й главных координат составляет 41.95%, 26.83% и 24.2% соответственно.

Исследование генетического полиморфизма популяции р. Колыма, самой восточной из исследованных нами популяций, привело к несколько неожиданному выводу. Ранее представлялось, что заселение р. Колыма сибирским осетром наиболее вероятно происходило из бассейна р. Лена на основании географической близости. Показано что популяции осетра из рек Колыма и Лена морфологически сходны (Рубан, Акимова, 1993). Однако проведенный генетический анализ не выявил схожести колымской и ленской популяций ни по митохондриальным, ни по ядерным маркерам. Популяция Колымы имеет наиболее массовым гаплотип ВаеН36 (17 особей из 21), который встречается в оз. Байкал, но не в р. Лена. Анализ попарных расстояний (F_{ST}) по микросателлитным маркерам также не выявляет близости

популяций Колымы и Лены, анализ главных компонент располагает самую восточную популяцию скорее с популяциями Байкала и Енисея, но не с соседним бассейном реки Лена. Эти данные свидетельствуют о независимом заселении бассейнов рек Лена и Колыма из общего рефугиума.

Несмотря на то, что систематика сибирского осетра относит популяции оз. Байкал и р. Енисей к разным подвидам (байкальский и узкорылый осетры), нам не удалось выявить достоверных генетических различий между этой парой популяций. Это может объясняться существовавшим потоком генов, обусловленным возможностью до постройки Братской ГЭС миграции осетров из оз. Байкал вниз по р. Ангаре до р. Енисей. Об отсутствии изоляции этих бассейнов писал Егоров (Егоров, 1961).

В результате проведенного исследования показано, что сибирский осетр представлен генетически хорошо различающимися группировками, соответствующими гидрографическим бассейнам – Обь-Иртышская, Байкало-Енисейская, Ленская и Колымская популяции. При получении и выпуске молоди сибирского осетра для искусственного воспроизводства, необходимо учитывать популяционную принадлежность производителей. Несмотря на отсутствие выявленных генетических дистанций между байкальской и енисейской популяциями, эти формы имеют ярко выраженные различия в биологии и адаптированы к разным условиям обитания. Поэтому при искусственном воспроизводстве байкальской и енисейской популяций, производители должны иметь локальное происхождение. Это позволит сохранить природное генетическое разнообразие и адаптивный потенциал локальных популяций.

3.3.3. Филогеография сибирского осетра

Предыдущие исследования мтДНК показали, что сибирский осетр образует близкородственный кластер с такими видами как русский, адриатический и персидский осетры (Bemis et al., 1997; Fontana et al., 2001; Birstein et al., 1997; Birstein, DeSalle, 1998) и имеет понто-каспийское происхождение. Миграция из каспийского в арктический бассейн (по данным анализа гена *CytB* - в начале миоцена, (Peng et al., 2007) привела к вселению предков сибирского осетра в реки арктического бассейна и, с тех пор сибирский осетр сформировался как вид, четко отличающийся от русского осетра как по морфологическим признакам, так и по эколого-биологическим характеристикам (рис. 3.6.).



Рисунок 3.6. Вселение предка сибирского осетра из Понто-Каспийского бассейна ~24 миллионов лет назад (датировка по Peng et al., 2007).

Исследование распределения гаплотипов в современных популяциях позволяет проследить постгляциальную историю вида. По результатам наших исследований митохондриальной ДНК, во всех популяциях

встречается по 2-3 массовых (мажорных) гаплотипа, а также большое число уникальных гаплотипов, отличающихся от массового на одну или несколько мутаций. Можно предположить, что наиболее часто встречаются гаплотипы, оставшиеся со времен заселения бассейна реки и участвовавшие в формировании новой популяции, а редкие – это результат накопления мутаций после того, как популяция была основана. Это свидетельствует об эффекте бутылочного горлышка – резком снижении численности предковой популяции сибирского осетра и последующем демографическом росте в условиях отсутствующего (или сильно ограниченного) потока генов. Данная гипотеза подтверждается тем фактом, что все выявленные массовые гаплотипы являются общими и встречаются в двух и более популяциях.

Исследование митохондриальной ДНК показало, что Байкальская популяция сибирского осетра, единственная из всех анализированных популяций, несет полный набор предковых мтДНК гаплотипов и, следовательно, с большой вероятностью, является наиболее старой из всех пяти природных популяций. Одно из крупнейших и древнейших озер, Байкал, по некоторым оценкам, насчитывает более 70 млн. лет непрерывной истории и в настоящее время является местообитанием чрезвычайно богатой и эндемичной фауны как древнего, так и относительно недавнего происхождения (Щербаков, 2003; Мац, Ефимова, 2011). Можно предположить, что в период оледенения Байкал был рефугиумом для сибирского осетра, который потом вновь распространился в основные сибирские реки через крупные послеледниковые озера, возникавшие в конце ледникового периода за счет подпруживания ледниковым щитом текущих на север сибирских рек (Mangerud et al., 2004) (рис. 3.7.).



Рисунок 3.7. Гипотеза вторичного расселения сибирского осетра из ледникового рефугиума (предположительно - оз. Байкал) и формирование современных популяций.

Тогда же происходил и перелив перигляциального озера в бассейн Аральского и Каспийского морей через Тургайское понижение (Mangerud et al., 2004; Ehlers et al., 2016), что могло привести к обратному вселению сибирского осетра в бассейн Каспия (зеленая стрелка на рис. 3.7). Последующая гибридизация вселившегося сибирского осетра с каспийской популяцией русского осетра привела к появлению так называемого "baerii-like" гаплотипа. Эта гипотеза объясняет происхождение «baerii-like» гаплотипа (Birstein et al., 2000; Jenneckens et al., 2000), встречающегося в настоящее время у 30% особей русского осетра в каспийской популяции (Мюге и др. 2008) и практически отсутствующего в Черном и Азовском морях (Мюге и др., 2008; Тимошкина и др., 2009).

3.4. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ СИБИРСКОГО ОСЕТРА В АКВАКУЛЬТУРЕ

В данной работе мы не ставим перед собой задачу изучить отдельные аквакультурные стада сибирского осетра, принадлежащие различным осетровым хозяйствам. Мы попытались отразить ситуацию в целом, понять, что произошло в аквакультуре сибирского осетра, самого востребованного вида в искусственном разведении осетровых за последние 30-40 лет, с момента начала массового развития осетроводства в нашей стране.

3.4.1. Исследование митохондриальной ДНК

При анализе 383 аквакультурных особей из РМС различного происхождения получены последовательности контрольного региона мтДНК длиной 680 п.н., выявлено 29 различных митохондриальных гаплотипов из 50, встреченных нами в природной популяции. Наибольшее количество различных гаплотипов обнаружено для аквакультуры обского и ленского происхождения – 13 и 9 соответственно; наименьшее – для енисейской и байкальской – 4 и 3 мтДНК гаплотипа. Следует сразу сказать, что аквакультура байкальского осетра развита очень слабо. Собранные нами в декабре 2011 г. образцы ремонта (всего 33 шт.) на Гусиноозерском и Селенгинском осетровых заводах представляют из себя потомство от одной самки, и, соответственно, имеют один мтДНК гаплотип на каждом заводе. Этим особей мы не учитывали в assignment test по микросателлитным данным, чтобы избежать объединения сибсов в отдельный кластер.

Из всех обнаруженных 29 гаплотипов, только четыре гаплотипа встречаются в двух из четырех групп выборок, основанных на происхождении. ВаеН7 встречается в аквакультуре ленского и енисейского происхождения, ВаеН5 в аквакультуре обского и енисейского происхождения, ВаеН32 характерен для рыб байкало-енисейского

происхождения, а ВаеН36 – для обских и байкальских аквакультурных стад. Остальные гаплотипы встречаются только в одной из исследованных групп единого природного происхождения. Также следует отметить, что подавляющее большинство особей «ленской» аквакультуры (более 93%) практически на всех осетровых заводах несут два гаплотипа - ВаеН7 и ВаеН3, остальные встречаются единично. Такая же картина характерна и для «обской» аквакультуры – около 82% особей обладают тремя гаплотипами - ВаеН4, ВаеН5 и ВаеН46. Распределение гаплотипов по популяциям представлено в таблице 3.21.

Таблица 3.21. Распределение выявленных гаплотипов сибирского осетра аквакультурного происхождения и их гаплотипное разнообразие (Hd)

№	№ НАР	Популяция	Количество. экз.	%	$Hd \pm Sd$ %
1	3	ленская	82	43.2	
2	7	ленская	95	50.0	
3	14	ленская	1	0.5	
4	17	ленская	3	1.6	
5	25	ленская	1	0.5	
6	43	ленская	1	0.5	
7	49	ленская	5	2.6	
8	50	ленская	1	0.5	
9	54	ленская	1	0.5	
		Итого:	190	100	56±1.7
1	8	байкальская	7	16.3	
2	32	байкальская	20	46.5	
3	36	байкальская	16	37.2	
		Итого:	43	100	63±3.6
1	5	енисейская	14	15.6	

2	7	енисейская	66	73.3	
3	12	енисейская	5	5.6	
4	32	енисейская	5	5.6	
		Итого:	90	100	44±5.8
1	4	обская	7	11.7	
2	5	обская	37	61.7	
3	9	обская	1	1.7	
4	10	обская	1	1.7	
5	13	обская	1	1.7	
6	18	обская	1	1.7	
7	36	обская	2	3.3	
8	40	обская	1	1.7	
9	44	обская	1	1.7	
10	46	обская	5	8.3	
11	47	обская	1	1.7	
12	51	обская	1	1.7	
13	55	обская	1	1.7	
		Итого:	60	100	60.6±7.0
		Всего:	383		

Проведенный анализ митохондриальной ДНК демонстрирует резкое падение полиморфизма при разведении осетров в аквакультуре по сравнению с природными популяциями. Не смотря на старания избежать обеднения генофонда Конаковским ОРЗ путем завоза партий икры, взятых из природной популяции из реки Лена в 1988 и 1991 г и добавлением этого материала к существующим генерациям 1973-1976 гг. (Породы..., 2008) искусственно полученные особи, разошедшиеся по всей европейской территории России и за ее границы, несут всего 9 различных мтДНК гаплотипов, два из которых (ВаеН3 и ВаеН7) встречены у 93% всех особей. Следует отметить, что

гаплотипы ВаеН3, ВаеН7 являются наиболее массовыми и в природной ленской популяции вида (23 и 29% соответственно), но при введении в аквакультуру эти два гаплотипа практически достигли фиксации (рис. 3.11.).

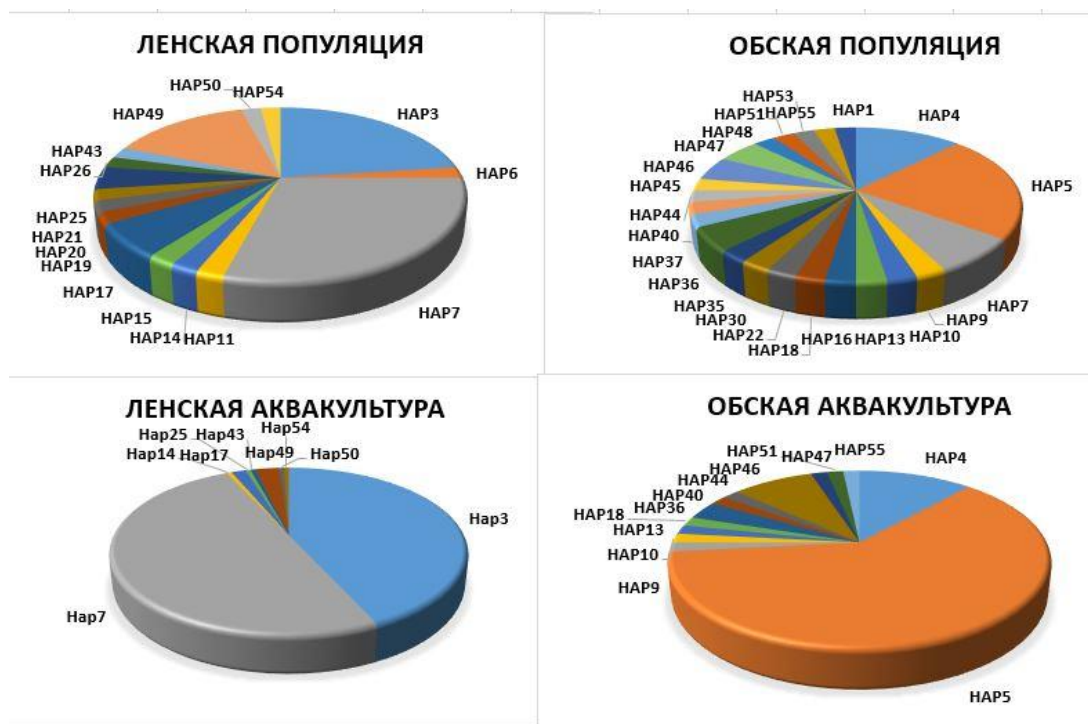


Рис. 3.11. Круговые гистограммы мтДНК гаплотипов в природных популяциях и аквакультуре ленского и обского происхождения.

У аквакультурных особей обского происхождения, выращиваемых на хозяйствах Западной Сибири выявлено 13 мтДНК гаплотипов, но, опять же, массово представлены только два гаплотипа – ВаеН4 и ВаеН5 (в сумме 73%), еще два встречаются редко, а остальные гаплотипы отмечены нами у единичных особей. Еще недавно обская аквакультура была представлена в основном domesticiрованными особями, но на настоящий момент уже сформированы стада, выращенные из икры и несоблюдение правил генетического менеджмента, отсутствие площадей и материальных возможностей для сохранения производителей в РМС очень быстро (за 1-2 поколения) привело к значительной потере генетического полиморфизма у аквакультурных осетров обского происхождения. (рис.3.11.).

Гаплотипное разнообразие (Hd) в ленской аквакультуре опустилось до 56%, хотя в природной популяции наблюдается на уровне 85%, аквакультура обского осетра имеет показатель Hd равный 60.6 %, тогда как в дикой популяции он равен 92.8%.

Дополнительно мы исследовали еще несколько РМС обского осетра, содержащихся на хозяйствах Тюменской области и Красноярского края (данные не представлены). Эти стада содержат особей, также несущих массово два мажорных мтДНК гаплотипа (ВаеН4 и ВаеН5) и до 3-5% других гаплотипов.

Аквакультура сибирского осетра енисейского и байкальского происхождения находится еще в зачаточном состоянии. К сожалению, состояние этих природных популяций на настоящий момент делает маловероятным формирование РМС из доместифицированных особей для поддержания генофонда и адаптивных возможностей этих популяций. На настоящий момент единичные экземпляры байкальского сибирского осетра (F1 и более) разбросаны по отдельным аквакультурным хозяйствам, а там, где сформировано «стадо» - его происхождение идет от одной, редко двух пар производителей, соответственно, генетическое разнообразие крайне мало для поддержания потенциала популяции в целом.

Небольшое стадо енисейского сибирского осетра сформировано в Красноярском крае на осетровом рыбноводном хозяйстве «Малтат», также некоторое количество доместифицированных особей содержится на небольших местных осетровых хозяйствах.

3.4.2. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов

Анализ 734 аквакультурных особей проводился с помощью тех же микросателлитных локусов, что и особей из природных популяций.

При проведении assignment test в программе *Structure* для сравнения в анализ добавлены образцы из диких популяций, чтобы подтвердить

популяционное происхождение аквакультурных особей. (таблица 3.24.) Образцы из природных популяций описаны и проанализированы в предыдущей главе.

В результате добавления особей из природных популяций, анализировалось 17 различных выборок (13 аквакультурных, представленных в таблице 2.4. и 4 природных, представленных в таблице 2.3.

Для адекватности выделения отдельных кластеров, в начале анализа мы определили оптимальное количество кластеров, на которые разбиваются полученные данные микросателлитного анализа в программе *Structure Harvester* (рисунок 3.12.). Мы определили оптимальное $K=4$, при анализе данных для K от 2 до 17 и при повторности $n=5$.

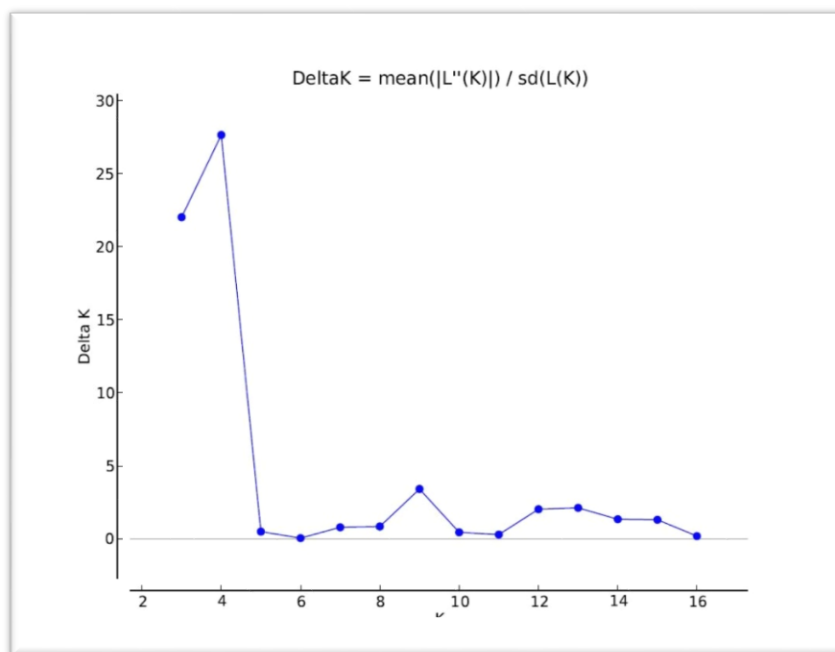


Рисунок 3.12. Оптимальное количество полученных кластеров (ΔK).

На рис.3.13. изображены апостериорные вероятности принадлежности особей к определенному кластеру. Все особи разбиваются на четыре хорошо заметных кластера: один из них содержит в себе группировку аквакультурных особей обского происхождения, а также особей из этой природной популяции; другой кластер включает в себя как диких, так и аквакультурных особей байкальского и енисейского происхождения. Это

ожидаемый результат, так как отсутствие генетической дифференциации между природными популяциями осетра оз. Байкал и р. Енисей показано нами ранее.

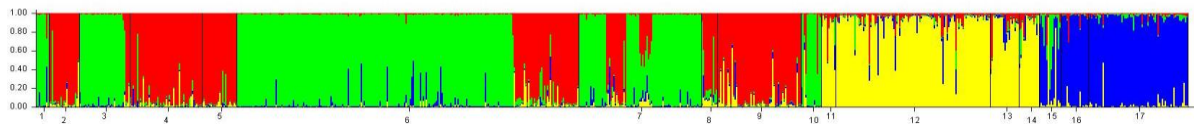


Рисунок 3.13. Апостериорная вероятность принадлежности к кластерам при $K=4$.

Обозначение выборок соответствуют таблице 3.22.

Интересный результат был получен для особей аквакультуры ленской популяции. Неожиданно, все 9 выборок из различных аквакультурных хозяйств и даже разные стада, содержащиеся на одном и том же хозяйстве, разбились на два четких кластера (красный и зеленый на рис. 3.13), один из которых (зеленый) общий с природной выборкой ленских осетров.

Анализ микросателлитных локусов показал, что наименьшее значение для дифференциации двух кластеров ленского происхождения имеет локус Afug161, а наибольшее локус Afug51. Значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности очень близки, что, в целом характерно для всех полиплоидных видов. Некоторые характеристики микросателлитных локусов представлены в таблице 3.23.

Таблица 3.22. Образцы, соответствующие выборкам при проведении assignment test в программе *Structure*.

№ выборки	Аквакультурное хозяйство	Кол-во образцов	Происхождение (популяция)	Цвет кластера
1	ООО "НПО "Кавитек"	9	ленская	зеленый
2	«Алексинский химкомбинат»	21	ленская	красный
3	"БИОС"	35	ленская	зеленый
4	«Волгореченскрыбхоз»	50	ленская	красный
5	ЗАО "ДагПИРХ"	24	ленская	красный
6	ООО РТФ «Диана»	191 46	ленская	зеленый красный
7	«Конаковский завод товарного осетроводства»	19 14 9 9 34	ленская	зеленый красный зеленый красно-зеленый зеленый
8	Адыгейский ОЗ	11	ленская	красный
9	РЗ «Ярославский»	57	ленская	красный
10	Природная ленская	14	ленская	зеленый
11	ООО РТФ «Диана»; Алексинский химкомбинат; Лучегорская НИРС	8 1 1	байкальская	желтый
12	РК «Малтат»	107	енисейская	желтый
13	Природная енисейская	20	енисейская	желтый
14	Природная байкальская	14	байкальская	желтый
15	Природная обь-иртышская	15	обь-иртышская	синий
16	УЗВ «Пышма-96»	19	обь-иртышская	синий
17	ФГБНУ «Госрыбцентр»	69	обь-иртышская	синий
	ИТОГО	797		

Таблица 3.23. Характеристика микросателлитных локусов

объедин. выборки	Лена-1			Лена-2			Обь			Енисей-Байкал			общая		
	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>Na</i>
локус диапазон, п.н.															
An20 145-185	0.98	0.97	10	0.97	0.99	8	0.99	0.94	11	1	0.98	11	1	0.98	11
AoxD165 168-210	0.98	0.95	14	0.92	0.92	11	0.99	1	17	0.99	0.99	18	0.97	0.96	18
Afug41 169-257	0.99	0.99	15	0.99	0.99	10	1	1	16	1	1	15	1	0.99	16
Afug51 228-300	0.99	0.92	16	0.92	0.81	5	1	0.92	19	0.99	0.92	18	0.97	0.88	19
AoxD161 98-146	0.99	1	11	0.99	1	11	1	1	13	0.99	1	13	0.99	1	13
Среднее значение	0.99	0.97	13.2	0.96	0.94	9	1	0.97	15.2	0.99	0.98	15	0.99	0.96	15.4

Наиболее интересный результат микросателлитного анализа – это разделение на два обособленных кластера аквакультурных особей ленского происхождения из всех исследованных нами стад. Если обратиться к таблице 2.4. к данным о годах рождения выборок аквакультурных особей, то в кластер, который содержит и особей из природной популяции попадают выборки 1990-1996 годов рождения, а в другой «аквакультурный» кластер попали выборки старше 2001 года рождения. Также в «аквакультурном» кластере наблюдается снижение количества аллелей на локус (таблица 3.23.), а именно исчезают редкие аллели, что характерно для популяций, находящихся в угнетенном депрессивном состоянии или, говоря об аквакультуре, количество используемых производителей недостаточно велико (менее 50 особей) (Примак, 2002). В нашем случае в первый «природный» кластер попало 297 особей, а в «аквакультурный» 243 особи, что позволяет нам сравнивать данные без введения поправок на неравномерную численность представленных выборок. Особенно резкое

снижение количества аллелей наблюдается у локуса Afug51 – с 16 до 5, и наблюдаемая гетерозиготность ($H_o = 0.81$) минимальна из всех исследованных локусов.

Возможно предположить, что в процессе селекционной работы, проводимой на Конаковском осетровом заводе при выведении одомашненной формы ленского осетра (Реестр..., 2016) (№ 9357522; дата внесения в госреестр 1993г.) и далее породы Лена 1 (Реестр..., 2016) (№ 9463263; дата внесения в госреестр 2008г.), в процессе селекции оставалось потомство небольшого числа особей. Если существенно сокращается количество используемых производителей, то в силу генетического дрейфа существует высокая вероятность, что редкие аллели будут утеряны, и через ряд поколений это может привести к инбредной депрессии и потере эволюционной пластичности. Для аквакультуры это может означать уменьшение устойчивости к болезням, увеличения доли уродств при развитии, уменьшении плодовитости и ухудшении товарных качеств получаемой продукции.

При этом следует учесть, что мы говорим сейчас о «ленской» аквакультуре в целом, но на практике между аквакультурными стадами, принадлежащими различным хозяйствам, как правило не происходит обмен производителями, чтобы поддержать генетическую гетерогенность стада. А значит, из года в год, используя малое количество доступных производителей, скрещивая между собой родителей и их же потомков, аквакультура сибирского осетра может очень быстро растерять весь адаптивный потенциал, свойственный данному виду.

В связи с вышесказанным, рекомендуется создать селекционные центры, в которых будет содержаться генетически разнородное маточное стадо с регулярно проводимым мониторингом и у которых аквакультурные хозяйства могли бы приобрести посадочный материал для поддержания генетического полиморфизма собственных стад сибирского осетра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам исследования микросателлитного анализа экспериментальных скрещиваний, у сибирского осетра обнаружены локусы, имеющие октаплоидную, тетрадную, диплоидизированную тетрасомную, дисомную, аномальную три и пентасомную природу наследования. Поэтому при изучении популяционно-генетической структуры вида, межвидовой дифференциации и других исследованиях необходимо выбирать такие маркеры, которые, с одной стороны, поддаются анализу существующим на сегодняшний момент статистическим аппаратом, т.е. использовать локусы, дающие генотип особи не более $2n-4n$. С другой стороны, маркеры, которые не приведут к искаженным некорректным статистическим расчетам в связи с присутствием нуль-аллеля при амплификации и отклонению от равновесия Харди-Вайнберга.

Изученная межвидовая дифференциация сибирского осетра и близкородственных видов осетровых по созданной микросателлитной панели, состоящей из пяти тетраплоидных локусов, не выявила четких диагностических маркеров (видоспецифичных аллелей) для идентификации особей сибирского, русского и персидского осетров, однако по аллельным частотам для выборки возможно проведение видовой идентификации с вероятностью от 96 до 75 %% в зависимости от вида. Для остальных видов осетровых, обитающих на территории России, удалось выявить четкие диагностические аллели, которые успешно используются для тестирования как особей чистого вида, так и особей различного гибридного происхождения при различных идентификациях, где затруднена или невозможна идентификация по принятым морфологическим критериям (например, продукция из осетровых).

В настоящее время естественные популяции осетровых в основном поддерживаются за счет их искусственного воспроизводства. При получении и выпуске молоди сибирского осетра для искусственного воспроизводства, необходимо учитывать популяционную принадлежность производителей.

Несмотря на отсутствие выявленных генетических дистанций между байкальской и енисейской популяциями, эти формы имеют ярко выраженные различия в биологии и адаптированы к разным условиям обитания. Поэтому при искусственном воспроизводстве любой популяции сибирского осетра, производители при возможности должны иметь локальное происхождение. Это позволит сохранить природное генетическое разнообразие и адаптивный потенциал местных популяций.

Предотвращение катастрофического падения генетического разнообразия содержащихся в аквакультуре ремонтно-маточных стад сибирского осетра, выявленное в результате данной работы, должно стать основной задачей на следующее десятилетие для сохранения эволюционной пластичности и адаптивного потенциала особей, содержащихся в неволе.

Создание селекционных центров с поддержанием в них маточного генетически разнородного стада сибирского осетра поможет сохранить генофонд и аллельное разнообразие, свойственное природной популяции этого вида.

ВЫВОДЫ

1. На основании изучения характера наследования 16 ранее опубликованных для различных видов осетровых рыб микросателлитных локусов выявлены локусы, являющиеся у сибирского осетра октаплоидными, диплоидизированными октаплоидными, тетраплоидными, диплоидизированными тетраплоидными, а также, возможно, диплоидными.
2. Пять локусов из 16 у сибирского осетра характеризуются генотипом не более $4n$, отсутствием нуль-аллелей, высокой воспроизводимостью амплификации и соответствием равновесию Харди-Вайнберга, что позволило создать на их основе панель для анализа популяционно-генетической структуры сибирского осетра.
3. Выявленные видоспецифичные аллели для 10 видов осетровых позволяют проводить идентификацию особей как чистого вида, так и гибридного происхождения. Дифференциация сибирского, русского и персидского осетров возможна лишь по частотам аллелей для межвидовых выборок.
4. Выявленная значимая генетическая дифференциация между популяциями сибирского осетра не соответствует ранее принятому делению этого вида на популяции (подвиды). Популяции рек Лена, Обь, Колыма четко отличаются друг от друга как по митохондриальным, так и по ядерным маркерам, генетическая дифференциация популяций из озера Байкал и реки Енисей не выявлена.
5. На основании проведенного филогеографического анализа предложена реконструкция истории вида; вероятно, первичным событием было вселение русского осетра из Понто-каспийского бассейна в Сибирь, формирование сибирского осетра происходило в реках Арктического бассейна. Предполагается существование рефугиума сибирского осетра в оз. Байкал с последующим независимым расселением в крупные реки Арктического бассейна, а также частичная миграция обратно в Каспий, где межвидовая

гибридизация привела к появлению массового "*baerii-like*" гаплотипа у русского осетра.

6. Генетический полиморфизм аквакультурных стад сибирского осетра «ленского» и «обского» происхождения демонстрирует резкое падение по сравнению с природным за относительно короткое время. В аквакультуре «ленского» происхождения произошло деление на два четких генетических кластера, в одном из которых наблюдается резкое снижение аллельного полиморфизма.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОРЗ - осетровый рыбоводный завод;

РМС - ремонтно-маточное стадо;

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

МСОП - Международный союз охраны природы и природных ресурсов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях: Учебное пособие. 3-е изд. М.: ИКЦ «Академкнига». 2003. 431 с.
2. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике. 2002 // Генетика. Т.38. № 9. С. 1173-1195.
3. Артюхин Е.Н. Осетровые: экология, геогр. распространение и филогения. Изд-во С.-Петербур. ун-та. 2008. 135 с.
4. Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых (*Acipenseridae*) и выявления особей гибридного происхождения // Генетика. 2013. Т. 49 (9). С. 1093–1105.
5. Берг Л.С. Фауна России и сопредельных стран. Рыбы. Т.1. // М.-Л.: Изд-во АН СССР . 1911. 337 с.
6. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран (в 3-х частях) // М.-Л.: Изд-во АН СССР. 1948. Ч. 1. 467 с.
7. Бирштейн В.Л. Цитогенетические и молекулярные аспекты эволюции позвоночных. М.: Наука. 1987. 284 с.
8. Бирштейн В.Я., Васильев В.П. Ядрышковые организаторы, их функционирование и полиплоидия у рыб // Ж. общ. биол. 1987. Т. 48, N 6. С. 729-747.
9. 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.
10. Бурцев И.А., Смольянов И.И., Гершанович А.Д., Николаев А.И. Методические указания по формированию и эксплуатации маточных стад сибирского осетра // ОНТИ ВНИРО. М. 1984. 23 с.

11. Бурцев И.А., Николаев А.И., Сафронов А.С., Крылова В.Д., Филиппова О.П. Методические указания по прижизненному получению икры у осетровых рыб. М.: ВНИРО. 1999. 10 с.
12. Васильев В.П. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука. 1985. 300 с.
13. 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.
14. Васнецов В.В. Рост рыб как адаптация // Бюлл. Моск. об-ва испыт. природы. 1947. Т. 52 (нов.сер.). Вып. 1. С. 22-34.
15. 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.
16. Гершанович А.Д., Бурцев И.А. Будут ли жить осетры в XXI веке. // Рыб. хоз-во. 1993. № 4. С.11.
17. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Том 2. Породы животных. М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2016. 172 с.
18. Гусейнов Э.М., Чародеев Г.А. Каспийское море может остаться без осетровых, а мы без Каспия. // «Известия». 1996. 6 июля.
19. Детлаф Т.А., Гинзбург А.С., Шмальгаузен О.И. Развитие осетровых рыб. // М. Наука. 1981. 224 с.
20. Дрягин П.А. Уловы осетра в водоемах Сибири. // Рыбн. хоз-во. 1947. Т.1.
21. Егоров А.Г. Байкальский осетр. 1961. Улан-Удэ. 122 с.
22. Иваненков В.В., Камшилин И.Н. Возможность использования фракций альбумина осетровых в качестве генетических маркеров в популяционных исследованиях // Вопросы ихтиологии. 1991. Т. 31. С. 234-243.

23. 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.
24. Красная книга Российской Федерации (животные) // РАН; Гл. ред. кол.: В.И. Данилов-Данильян и др.—М.: АСТ: Астрель. 2001. 862 с.
25. Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. 1987. Л.: Наука. 520 с.
26. Кузьмин Е.В., Лукьяненко В.В. Гетерогенность и полиморфизм сывороточных альбуминов сибирского осетра енисейской популяции // Экологическая физиология и биохимия рыб. Киев: «Наукова думка». 1982. С.18.
27. Кузьмин Е.В., Лукьяненко В.В. Гетерогенность и полиморфизм сывороточных альбуминов сибирского осетра обской популяции // Осетровое хозяйство водоемов СССР. Астрахань. 1984. С. 160-170.
28. Кузьмин Ю.В. Сравнительное исследование аллозимов мышечной малат дегидрогеназы в популяциях сибирского осетра *Acipenser baerii* р. Обь и стерляди *A. ruthenus* р. Дон и Камы // Вопросы ихтиологии. 1991. Т. 31. С. 139-144.
29. Кузьмин Е.В. Альбуминовая система сыворотки крови осетрообразных в речной период жизни // Вопр. ихтиол. 1996. Т. 36, № 1. С. 101-108.
30. Лукьяненко В.И., Гераскин П.П., Баль Н.В. Гетерогенность и полиморфизм гемоглобина у двух видов рода *Huso* // Докл. АН СССР. 1977. Т. 237. № 4. С. 994-997.
31. Макаров Э.В. О структуре нерестовой популяции азовских осетровых. // Тр. ЦНИОРХ. 1970 а. Т.2.
32. Макаров Э.В., Житенева Л.Д., Абросимова Н.А. Живые ископаемые близки к вымиранию. Научный очерк об осетровых. // Ростов-на-Дону. 2000. 144 с.

- 33.Макаров Э.В. К оценке естественной смертности азовских осетровых.
// Тр. ЦНИОРХ. 1970 б. Т.2.
- 34.Малютин В.С., Рубан Г.И. К истории рыбоводного освоения сибирского осетра *Acipenser baerii* реки Лена для целей акклиматизации товарного выращивания // Вопросы ихтиологии. 2009. Т. 49. № 3. С. 389-395.
- 35.Миллер Р. Четвертичные пресноводные рыбы Северной Америки. Четвертичный период в США. 1969. Т. 2. С.174-192.
- 36.Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Расторгуев С.М. и др. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика. 2008. Т. 44. С. 1–7.
- 37.Мюге Н.С., Барминцева А.Е. Методика генотипирования производителей и молоди осетровых видов рыб с целью проведения генетического мониторинга искусственного воспроизводства. // Actual status and conservation of natural population of sturgeon fish *Acipenseridae*. Olsztyn. 2014. P. 159-165.
- 38.Нефедов С.А., Демкина Н.В., Новикова Е.В., Нефедова И.В. Формирование маточного стада сибирского осетра *Acipenser baerii* Brandt обской популяции в промышленных условиях и оценка его генетической гетерозиготности // Вопросы рыболовства. 2008. Т. 9. №3 (35). С. 717-723.
- 39.Никитина Т.В., Назаренко С.А. Микросателлитные последовательности ДНК человека: мутационный процесс и эволюция. 2004. // Генетика. Т.40. № 10. С. 1301-1318.
- 40.Никольский А.М. Гады и рыбы. // Петроград.: Брокгауз-Ефрон. 1902. 872 с.
- 41.Николюкин Н.И. Отдаленная гибридизация осетровых и костистых рыб (теория и практика). М.: Пищевая промышленность. 1972. С. 255, 282.

42. Павлов Д.С., Скоробогатов М.А. Миграции рыб в зарегулированных реках // М. Товарищество научных изданий КМК. 2014. 413 с.
43. Палатников Г.М., Касимов Р.Ю. Осетровые – современники динозавров. Баку. 2008. 70 с.
44. Породы и одомашненные формы осетровых рыб. М.: ООО «Столичная типография». 2008. С.23.
45. Примак Р. Основы сохранения биоразнообразия М.: Издательство Научного и учебно-методического центра. 2002. 256 с.
46. Рубан Г.И., Акимова Н.В. Особенности экологии сибирского осетра *Acipenser baerii* реки Колымы // Вопросы ихтиологии .1993. Т 33. № 1. С. 84-92.
47. Рубан Г.И., Панаиотиди А.И. Сравнительный морфологический анализ подвидов сибирского осетра *A. baeri stenorrhynchus* и *A. baerii chatys* рек Енисей и Лена // Вопр. ихтиологии. 1994. Т. 34, N 4. С. 469-478.
48. Рубан Г.И. О структуре вида сибирского осетра *Acipenser baerii* Brandt // Вопросы ихтиологии. 1998. Т. 38. № 3. С. 307-327.
49. Рубан Г.И. Сибирский осетр *Acipenser baerii* Brandt (структура вида и экология). М.: ГЕОС, 1999. 235 с.
50. Рубан Г.И., Ходоревская Р.П., Кошелев В.Н. О состоянии осетровых в России // Астраханский вестник экологического образования. 2015. № 1(31), С. 42-50.
51. Руководство по искусственному воспроизводству осетровых рыб 558: технический доклад ФАО по рыбному хозяйству, продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН. Анкара. 2013. С. 214-216.
52. Рябова Г.Д., Офицеров М.В., Шишанова Е.И. Исследование связи между аллозимной изменчивостью и некоторыми компонентами приспособленности у севрюги *Acipenser stellatus* Pallas // Генетика. 1995. Т. 31. № 13. С. 1679-1692.

53. Сальников В.Б., Мейден Р.Л., Кухайда Б.Р. Исследование биологии большого амударьинского лопатоноса *Pseudoscaphirhynchus kaufmanni* (Actinopterygii: Acipenseriformes: Acipenseridae) с использованием методов мечения и телеметрического слежения. Науч. сборник: Изучение биоразнообразия Туркменистана (позвоночные животные). (Посвящается 95-летию А.К. Рустамова и 60-летию Э.А. Рустамова). Москва-Ашхабад. 2013. С. 90-113. 284 с.
54. Смольянов И.И. Технологии формирования и эксплуатации маточных стад сибирского осетра в тепловодных хозяйствах. М.: ВНИИПРХ. 1987. 43 с.
55. Соколов Л.И., Цепкин Е.А. Осетровые Азово-Черноморского и Каспийского бассейнов (исторический обзор) // Вопр. ихтиол. 1996. Т. 36(1). С.15-27.
56. Строганов Н.С. Акклиматизация и выращивание осетровых рыб в прудах // Эколого-физиологические и биохимические исследования. М.; МГУ. 1968. 377 с.
57. Субботкин М.Ф. Сравнительный иммунохимический анализ межвидовых и внутривидовых особенностей сывороточных белков трех видов осетровых рода *Acipenser* // Вопросы ихтиологии. 1987. Т. 27. № 5. С. 794-800.
58. Сэффрон И. Икра. Светлое прошлое и темное будущее великого деликатеса // Москва. 2006. с. Вещи в себе. Изд-во «КоЛибри». 360 с.
59. Тимошкина Н.Н., Барминцева А.Е., Усатов А.В., Мюге Н.С. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) // Генетика. 2009. Т. 45. № 9. С. 1250-1259.
60. Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Усатов А.В. Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (*Acipenseriformes*) // Экологическая генетика. 2010. Т. VIII. № 1. С. 12–24.

61. Ходоревская Р.П. Поведение, распределение и миграции осетровых рыб Волго-Каспийского бассейна. Автореф. дисс. д-ра биол. наук М.: ИПЭЭ РАН, 2002. 60 с.
62. Ходоревская Р.П., Романов А.А. Изменение распределения и численности осетровых в Каспийском море // Аквакультура осетровых рыб: достижения и перспективы развития: Материалы докл. IV Межд. Научно-практической конференции, 13-15 марта 2006 г. Астрахань. М.: Изд-во ВНИРО. 2006. С. 12-15.
63. Цветненко Ю.Б. Оценка влияния искусственного воспроизводства и интродукции на генетическую структуру популяцию азовских осетровых // Тр. ВНИРО. 1984. С. 114-125.
64. Цветненко Ю.Б. Эффективность и генетические последствия интродукции севрюги *Acipenser stellatus* из Каспийского в Азовский бассейн // Вопросы ихтиологии. 1993. Т. 33. № 3. С. 382-387.
65. Черняк А.Л. Редкий гость. Шип. // Ихтиосфера отечественных вод. 2009. весна-лето.
66. Чихачев А.С., Цветненко Ю.Б. Оценка влияния искусственного воспроизводства и интродукции на генетическую структуру популяции азовских осетровых // Воспроизводство рыбных запасов Каспийского и Азовского морей. М.: ВНИРО. 1984. С. 114-125.
67. Щербаков Д.Ю. Сравнительное исследование эволюционных историй букетов видов байкальских беспозвоночных: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб. – М.: ЗИН РАН, 2003. 39 с.
68. Яковлев В.Н. Филогенез осетрообразных. Очерки по филогении и систематике ископаемых рыб и бесчелюстных. М.: Наука. 1977. С. 116-144.
69. 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. P. 4692–4693.

70. Beaumont A., Hoare K. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Blackwell Science. UK. 2003. 158 p.
71. Bemis W.E., Findeis E.K., Grande L. An overview of Acipenseriformes. // *Env. Biol. Fish.* 1997. V. 48. P. 25–71.
72. Bemis W.E., Kynard B. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history // *Environmental Biology of Fishes.* 1997. V. 48. P. 167-183.
73. Birstein V.J., Poletaev A.I., Goncharov B.F. DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry // *Cytometry.* 1993. V. 14. № 4. P. 377–383.
74. Birstein V.J., Bemis W.E., Waldman J. The threatened status of Acipenseriform species: a summary *In Sturgeon Biodiversity and Conservation.* // Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1997. P. 427 – 435.
75. 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. P. 127–155.
76. Birstein V.J., DeSalle R. Molecular phylogeny of Acipenserinae // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1998. V. 9. P. 141–155.
77. Birstein V.J., Ruban G.I., Doukakis P., DeSalle R. Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species *Acipenser baerii*, *A. stellatus* // *Molecular Ecology.* 1999. N 8. P. 117-127.
78. Birstein V.J., Doukakis P., DeSalle R. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: Forensic and evolutionary implications. *Conservation Genetics.* 2000. V.1. P. 81-88.
79. Birstein V.J. Sturgeon species and hybrids: can hybrids produce caviar? // *Environmental Policy and Law.* 2002. V.32. P. 210-214.

80. Birstein V.J., Doukakis P., DeSalle R. Molecular Phylogeny of Acipenseridae: Nonmonophyly of Scaphynchinae. // *Copeia*. 2002. V. 2. P. 287-301.
81. Birstein V.J., Ruban G. A comment on the Siberian, *Acipenser baerii*, and Russian, *Acipenser gueldenstaedtii*, sturgeons. // *Environmental Biology of Fishes*. 2004. V. 70. № 1. P. 91-92.
82. Birstein V.J. Phylogeny and Evolution of Acipenseriformes: New Molecular and Genetic Data Create New Puzzles// ЭВОЛЮЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ: ИСТОРИЯ И ТЕОРИЯ. 2005. Издательство СПб института истории РАН «Нестор-История» Выпуск 3. С. 231-269.
83. Birstein V., Ruban G.I., Ludvig A., Doukakis P., DeSalle R. The enigmatic Caspian Sea Russian sturgeon: How many cryptic forms does it contain? // *Systematics and Biodiversity*. 2005. V.3 № 2. P. 203-218.
84. Birstein V.J., Waldman J.R., Bemis W.E. Sturgeon biodiversity and conservation // Springer. 2006.
85. Birstein V.J., Desalle R., Doukakis P. et al. Testing taxonomic boundaries and the limit of DNA barcoding in the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* // *Mitochondrial DNA*. 2009. V. 20 (5–6). P. 110–118.
86. Boscarri E., Barmintseva A., Pujolar J.M., Doukakis P., Mugue N., Congiu L. Species and hybrid identification of sturgeon caviar: a new molecular approach to detect illegal trade. // *Mol Ecol Resour*. 2013. Nov 12. doi: 10.1111/1755-0998.12203. [Epub ahead of print]
87. Brandt J.F. Einige Worte uber die europaisch-asiatischen Storarten (Sturionides), von Johann Friedrich Brandt (Lu le 20 mai 1869) // *Bulletin de L'Academie Imperiale des Sciences De St.-Petersbourg*. 1870. V. 14. P. 171-175.
88. Bronzi P., Rosenthal H., Gessner. J. Global sturgeon aquaculture production: an overview // *J. Appl. Ichthyol*. 2011. V. 27. P. 169–175.

89. Bronzi P., Rosenthal H. Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview // *J. Appl. Ichthyol.* 2014. V. 30. P. 1536–1546.
90. Brown J.R., Beckenbach K., Beckenbach A.T., Smith M.J. Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (*Acipenser*) // *Genetics.* 1996. V. 142(2). P. 525-535.
91. Callen D.F., Thompson A.D., Shen Y., Phillips H., Richards R., Mulley J.C., Sutherland G.R. Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)_n microsatellite markers // *American Journal of Human Genetics.* 1993. V. 52. P. 922-927.
92. Carlsson J. Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing // *Heredity.* 2008. V.99. № 6. P. 616–623.
93. Chicca M., Suci R., Ene C., Lanfredi M. et al. Karyotype characterization of the stellate sturgeon, *Acipenser stellatus* by chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. // *J. Appl. Ichthyol.* 2002. V.18. P.298.
94. Clark L.V., Jasieniuk M. POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis // *Mol. Ecol. Res.* 2011. May V.11(3). P. 562-566.
95. Clement M., Posada D., Crandall K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // *Mol. Ecol.* 2000. № 9(10) P. 1657–1660.
96. Congiu L., Fontana F., Patarnello T., Rossi R., Zane L. The use of AFLP in sturgeon identification. // *J. Appl. Ichthyol.* 2002. V. 18. P. 286-289.
97. Congiu L., Pujolar J.M., Forlani A., Cenadelli S., Dupanloup I., Barbisan F., Galli A., Fontana F. Managing polyploidy in ex situ conservation genetics: the case of the critically endangered Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // *PloS one.* 2011. V.6. № 3. e18249.
98. 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). P. 432-436.

99. DeSalle R., Amato G. The expansion of conservation genetics // *Nature Rev Genet.* 2004. № 5. P.702–712.
100. Dillman C., Wood R.M., Kuhajda B., Ray J., Salnikov V.B., Mayden R. Molecular systematics of Scaphirhynchinae: An assessment of North American and Central Asian Freshwater Sturgeon Species. // *J. Appl. Ichthyol.* 2007. V.23(4). P. 290-296.
101. Dudu A., Radu S., Paraschiv M. Nuclear markers of Danube sturgeons hybridization. // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V.12(10). P.6796–6809.
102. Earl D.A., Von Holdt B.M. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. // *Cons. Genet. Res.* 2012. V. 4. P. 359-361.
103. Ehlers J., Hughes Ph., Gibbard Ph. *The Ice Age.* // Wiley-Blackwell. 2016. 560 p.
104. Ellegren H., *Microsatellites: simple sequences with complex evolution* // *Nature Reviews Genetics.* 2004. V.5. P. 435-445.
105. Eschmeyer, W. N. and R. Fricke, and R. van der Laan (eds). *CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES.* (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed 26 Feb. 2018.
106. Excoffier L., Lischer H.E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Res.* 2010. V.10. P. 564-567.
107. Fain S.R., Straughan D.J., Hamlin B.C., Hoesch R.M., LeMay J.P. (2013) Forensic genetic identification of sturgeon caviars traveling in world trade. // *Conservation Genetics.* 2013. V. 14. P. 855-874.
108. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. // *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994 V.3(5). P.294-299.

109. Fontana F. Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces) // *Genome*. 1994. V. 37(5). P. 888-892.
110. Fontana F., Tagliavini J., Congiu C. Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives // *Genetica*. 2001. V.111. P.359–373.
111. Fontana F. A cytogenetic approach to the study of taxonomy and evolution in sturgeons. // *J. Appl. Ichthyol.* 2002. V.18. P. 226-233.
112. 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. P. 385–403.
113. 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. P. 113–119.
114. Fopp-Bayat D., Luczynski M. Microsatellite DNA polymorphism in sturgeon species and their hybrids reared in Polish aquaculture farms // *Environmental biotechnology*. 2006. V.2(1). P. 11-19.
115. Fopp-Bayat D. Inheritance of microsatellite loci in polyploid Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) based on uniparental haploids. // *Aquaculture Research*. 2008. V 39. P. 1787–1792.
116. Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2017. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, (accessed 02/2018)
117. Georgescu S.E., Canareica O., Dudu A., Costache M. Analysis of the microsatellite variation in the common hybrid between Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) from aquaculture // *Transylv. Rev. Syst. Ecol. Res.*"The Wetlands Diversity". 2013. V. 15(2). P.117-124.
118. Georgi I.G. Bemerkungen einer Reise im Rissishen Reiche im Jahre 1772. Bd.1. 1775. St.-Petersburg. 506 p.

119. Grande L., Bemis W.E. Osteology and phylogenetic relationships of fossil and recent paddlefishes (Polyodontidae) with comments on the interrelationships of Acipenseriformes. // Journal of Vertebrate Paleontology. 1991. V. 11. P. 1-121.
120. Grande L., Bemis W.E. Interrelationships of Acipenseriformes, with comments on "Chondrostei". Interrelationships of Fishes (Ed. by M. Stiassny, L. Parenti and G.D. Johnson). Academic Press. San Diego. 1996. P. 85-115.
121. Hardy O.J, Vekemans X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels // Mol. Ecol. Notes. 2002. V.2. P. 618-620.
122. 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). P. 704–708.
123. Havelka M., Hulák M., Ráb P. et al. Fertility of a spontaneous hexaploid male Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* // BMC Genetics. 2014. 15:5 <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/15/5>
124. Havelka M., Fujimoto T., Hagihara S., Adachi S., Arai K. Nuclear DNA markers for identification of Beluga and Sterlet sturgeons and their interspecific Bester hybrid //Scientific Reports. 2017. 7: 1694 | DOI:10.1038/s41598-017-01768-3
125. Hebert P.D.N., Cywinska A. et al. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2003. V. 270(1512). P. 313-321.
126. Henderson-Arzapalo A., King T.L. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management // Mol.Ecol.Notes. 2002. V.2. P. 437-439.
127. Hilton E.J., Grande L. Review of the fossil record of sturgeons, family Acipenseridae (Actinopterygii: Acipenseriformes), from North America. // Journal of Paleontology. 2006. V. 80. P. 672-683.

128. International Union for Conservation of Nature (2016). The IUCN Red List of Threatened Species, Version 2016-1, www.iucnredlist.org (accessed 25 Feb. 2018).
129. 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. P. 998–1002.
130. Jahrl J. WWF report: Illegal caviar trade in Bulgaria and Romania – Results of a market survey on trade in caviar from sturgeon (Acipenseridae). WWF Austria & TRAFFIC, Vienna, Austria. 2013.
131. 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), P. 503-508.
132. 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. P. 39-42.
133. Khabarov M.V., Luk'yanenko V.V., Luk'yanenko V.I. Heterogeneity and polymorphism of hemoglobin and albumin of the Russian sturgeon in the sea and the river life periods // *J. App. Ichthyol.* 2002. V. 18(4-6). P. 351-358.
134. Khodorevskaya R.P., Ruban G.I., Pavlov D.S. Behaviour, migrations, distribution, and stocks of sturgeons in the Volga-Caspian Basin. World Sturgeon Conservation Society: Special Publication № 3. Germany. Norderstedt: Books on Demand GmbH. 2009. 233 p.
135. Kim D.S., Nam Y.K., Noh J.K., Park C.H., Chapman F.A. Karyotype of North American shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* with the highest chromosome number in the Acipenseriformes. // *Ichthyol. Res.* 2005. V. 52. P. 94–97.

136. King T.L., Lubinski B.A., Spidle A.P. Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and cross-species amplification in Acipenseridae. // Journal of Conservation Genetics. 2001. V. 2. P. 103-119.
137. Krieger J., Fuerst P.A., Cavender T.M. Phylogenetic relationships of the North American sturgeons (Order Acipenseriformes) based on mitochondrial DNA sequences. // Mol. Phylo. Evol. 2000. V. 16. P. 64-72.
138. Krieger J., Fuerst P. A. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes // Mol. Biol. Evol. 2002. V.19(6). P. 891–897.
139. 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. P. 36-45.
140. Lanfredi M., Congiu L., Garrido-Ramos M. A., de la Herran R., Leis M., Chicca M., Rossi R., Tagliavini J., Ruiz Rejon C., Ruiz Rejon M., Fontana F. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species // Chromosome Res. 2001.V. 9(1). P. 47-52.
141. Le Comber S.C., Smith C. Polyploidy in fishes: patterns and processes. // Biological journal of the Linnean society. 2004. V. 82. P. 431-442.
142. Lu L. A new paddlefish from the Upper Jurassic of northeast China. // Vertebr. Palasiat. 1994. V. 32. P. 134-142.
143. 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. P. 1203–1215.
144. Ludwig A. Identification of Acipenseriformes species in trade // J. Appl. Ichtiol. 2008. V. 24(1). P. 2-19.

145. Ludwig A., Arndt U., Lippold S., Benecke N., Debus L., King T.L., Matsumura S. Tracing the first steps of American sturgeon pioneers in Europe. // *BMC Evolutionary Biology* .2008. V. 8. P. 221.
146. Ludwig A., Lippold S., Debus L., Reinartz R. First evidence of hybridization between endangered starlets (*Acipenser ruthenus*) and exotic Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) in the Danube River. // *Biol. Invasions*. 2009. V. 11. P. 753–760.
147. 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). P. 151-182.
148. Mamuris Z., Stamatis C., Bani V., Triantaphyllidis C. Taxonomic relationships between four species of the Mullidae family revealed by three genetic methods: allozymes, random amplified polymorphic DNA and mitochondrial DNA // *J. Fish Biol.* 1999. V. 55. P. 572-587.
149. Mangerud J., Jakobsson M., Alexandersonk H. et al. Ice-dammed lakes and rerouting of the drainage of northern Eurasia during the Last Glaciation // *Quat. Sci. Rev.* 2004. V. 23. P. 1313–1332.
150. Mats V.D., Yefimova I.M. Paleogeographic scenario of the Late Cretaceous – Cenozoic for the central part of the Baikal region // *Geodynamics & Tectonophysics*. 2011. V. 2. № 2. P. 175–193.
151. May B., Krueger C.C., Kincaid H.L. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus* // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1997. V.54(7). P. 1542–1547.
152. McQuown E., Krueger C.C., Kincaid H.L., Gall G.A.E., May B. Genetic comparison of lake sturgeon populations: Differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite loci // *Journal of Great Lakes Research*. 2003. V. 29(1). P. 3-13.

153. McQuown E., Gall G.A.E., May B. Characterization and Inheritance of Six Microsatellite Loci in Lake Sturgeon // Transactions of the American Fisheries Society. 2002. V. 131(2). P. 299–307.
154. Nebesikhina N. A., Barmintseva A. E., Timoshkina N.N. The discovery triploid hybrid Russian sturgeon and beluga (*Acipenser gueldenstaedtii* x *Huso huso*) in the Western Black Sea// Molecular Phylogenetics: Contributions to the 3rd Moscow International Conference "Mol Phy1" (Moscow, Russia, July 31-August 4, 2012). P .9.
155. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. N 12. P. 3321-3323.
156. Park S.D.E. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection // Ph.D. thesis University of Dublin. 2001.
157. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. 2006. V. 6. P. 288–295.
158. 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). P. 854-862.
159. Pikitch E.K., Doukakis P., Lauck L., Chakrabarty P., Erickson L. Status, trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries. // Fish and Fisheries. 2005. V.6. P. 233-265.
160. Pourkazemi M. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. // University of Wales. 1996. 260 p. (Ph.D. thesis)
161. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data // Genetics. 2000. V. 155. P. 945–959.

162. Pyatskowitz J.D., Krueger C.C., Kincaid H.L., May B. Inheritance of microsatellite loci in the polyploid lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). // Genome. 2001. V. 44(2). P.185-191.
163. Rajkov J., Shao Z., Berrebi P. Evolution of polyploidy and diploidization in sturgeons: microsatellite analysis in 10 sturgeon species // Journal of Heredity. 2014. V. 105(4). P. 521-531.
164. Raymakers C., Hoover C. Acipenseriformes: CITES implementation from Range States to consumer countries // J. Appl. Ichthyol. 2002. V. 18(4–6). P. 629–638.
165. 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). P. 53–65.
166. Rodzen J.A., May B. Inheritance of microsatellite loci in the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Genome. 2002. V.45(6). P. 1064-1076.
167. Rosenthal H., Gessner J., Bronzi P. Conclusions and recommendations of the 7th International Symposium on Sturgeons: Sturgeons, Science and Society at the cross-roads – Meeting the Challenges of the 21st Century. // J. Appl. Ichthyol. 2014. V. 30. P. 1105–1108.
168. Rozas J. DNA Sequence Polymorphism Analysis using DNAsp. In Posada. D. (ed.) Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology .NJ. USA: Humana Press. 2009. V.537. P. 337-350.
169. Ruban G.I. Species structure, contemporary distribution and status of the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* // Env. Biol. Fish. 1997. V. 48. P. 221-230.
170. Ruban G.I. The Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt: Species structure and ecology // Special Publication No. 1.Norderstedt, Germany: Books on Demand, GmbK World Sturgeon Conservation Society. 2005.

171. Ruban G.I., Pavlov D.S., Sokolov L.I. On the types of spawning migrations in sturgeon fishes (Acipenseriformes) of the world fauna // Journal of Ichthyology. 2001. V. 41(2). P. 225-236.
172. 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). P. 24-33.
173. Schultz R.J. Role of polyploidy in the evolution of fishes. // Basic Life Sci. 1979. V. 13. P. 313-340.
174. Smith C.T., Nelson R.J., Pollard S., Rubidge E., McKay S.J., Rodzen J., May B., Koop B. Population genetic analysis of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in the Fraser River // J. Appl. Ichthyol. 2002. V. 18. P. 307-312.
175. Smith P., McVeagh M. Allozyme and microsatellite DNA markers of toothfish population structure in the Southern Ocean // J. Fish Biol. 2000. V. 57. P. 72-83.
176. Sokolov L.I., Vasilev V.P. *Acipenser baeri* Brandt, 1869. // In J. Holcík (ed.) The fresh water fishes of Europe. 1989. V. 1. Part. II: General introduction to fishes, Acipenseriformes. P. 262-284.
177. 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). P. 17-22.
178. The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) Volume 1 – Biology Editors: Williot P., Nonnotte G., Vizziano-Cantonnet D., Chebanov M. // Springer International Publishing. 2018 497 p.
179. 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. P. 51–61.

180. 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. P. 97-117.
181. Vasil'eva 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). P. 861–867.
182. 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). P. 950-959.
183. Wei Q.W., Zou Y., Li P., Li L. Sturgeon aquaculture in China: progress, strategies and prospects assessed on the basis of nation-wide surveys (2007-2009). // J. Appl. Ichthyol. 2011. V. 27. P. 162-168.
184. Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. 2nd ed. Taylor and Francis Group. Boca Raton. USA. 2005. 444 p.
185. 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. P. 47-55.
186. Welsh A.B., May B. Development and standardization of disomic microsatellite markers for lake sturgeon genetic studies. // J. Appl. Ichthyol. 2006. V. 22(5). P. 337–344.
187. Welsh A.B., Hill T., Quinlan H., Robinson C., May B. Genetic Assessment of Lake Sturgeon Population Structure in the Laurentian Great Lakes // North American Journal of Fisheries Management. 2008. V. 28(2). P. 572-591.

188. Williot P., Sabeaub L., Gessner J. et al. Sturgeon farming in Western Europe: recent developments and perspectives // *Aquat. Living Resour.* 2001. V. 14. P. 367–374.
189. Wolf D.E., Takebayashi N., Rieseberg L.H. Predicting the risk of extinction through hybridization. // *Conserv. Biol.* 2001. V. 15. P. 1039–1053.
190. Wozney K.M., Haxton T.J., Kjartanson S., Wilson C.C. Genetic assessment of Lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) population structure in the Ottawa River // *Environ. Biol. Fish.* 2011. V.90. P. 183-195.
191. Wright J.M. DNA fingerprinting in fishes / In Hochachka P.W. and Mommsen T. eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdam: Elsevier. 1993. V. 2. P. 58-91.
192. Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // *Mol. Ecol. Notes.* 2002. V.2. P.586-588.
193. Zhan A., Hu J., Hu X. et al. Construction of microsatellite-based linkage maps and identification of size-related quantitative trait loci for Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) // *Animal Genetics.* 2009. V. 40. P. 821-831.

ПРИЛОЖЕНИЕ. Таблица S1. Генотипы родительских особей экспериментальных скрещиваний по 13 исследованным микросателлитным локусам.

№ скрещивания	вид особи	П о л	локусы						
			Afug112	Afug135	Afug174	An20	AoxD161	AoxD165	AoxD234
1	<i>A.baerii</i>	♀	249/265	185/189/201/205		157/161/161/169	110/118/134/134	200/200/200/ 208	212/236/236/ 244
2	<i>A.baerii</i>	♀	257/265	197/201/205/221	146/146	145/145/165/173	110/122/130/130	180/180/180/ 188	200/200/224/ 236
	<i>A.baerii</i>	♂	241/257	193/197/201/201	142/142	165/169/173/173	110/110/130/134	176/180/188/ 196	236/240/244/ 244
3	<i>A.baerii</i>	♀	271x2	185/201/201/217	144x4	149/153/161/161	110/110/126/130	178/180/184/ 196	236/252/256/ 0
	<i>A.ruthenus</i>	♂	217/241	185/205/213/217	146x2	157/177	102/122	188/188	284/292
4	<i>A.gueldenstaedtii</i>	♀	249/261	193/193/197/201	144/146	165/165/169/173	86/126/130/134	174/178/178/ 186	200/212/232/ 248
	<i>A.gueldenstaedtii</i>	♂	241/249	185/189/197/205	144/144	161/165/173/177	110/114/130/138	178/178/178/ 194	208/240/244/ 244
5	<i>A.ruthenus</i>	♀	225/0	189/189/205/213	146/146	177/177	102/126	178/182	288/292
	<i>H.huso</i>	♂	225/229	189/193/209/213	146/146	145/149	98/98	178/178	252/252
6	<i>A.stellatus</i>	♀	239/239	193/197	138/146	141/141	122/130	182/186	180/236
	<i>A.ruthenus</i>	♂	225/229	193/201/205/205	142/142	165/177	118/122	178/186	292/296
7	<i>A.stellatus</i>	♀	239/239	193/197	142/142	141/129	122/134	182/198	180/232
	<i>A.stellatus</i>	♂	235/239	193/197	142/142	141/141	118/118	186/206	228/244
8	<i>A.ruthenus</i>	♀	225/229	185/205/205/205	146/146	177/177	102/106	178/178	264/272
	<i>H.huso</i>	♂	225/225	189/197/213/221	138/146	145/145	98/102	178/182	232/252

Таблица S1(продолжение). Генотипы родительских особей экспериментальных скрещиваний по 13 исследованным микросателлитным локусам.

№ скрещивания	вид особи	Пол	ЛОКУСЫ					
			Afug41	Afug51	Afug63	Afug65	Afug67	Afug95
1	<i>A.baerii</i>	♀	197/197/209/225	242/254/258/262	114x2/130x2	152/156/156/164/168/168/176/176	182/194/194/198	217x4
2	<i>A.baerii</i>	♀	197/197/205/209	246/254/262/280	114x2/138x2	152/152/164/168/176/176/188/188	182/190/190/198	217x3/221
	<i>A.baerii</i>	♂	217/225/245/249	254/254/272/276	130/0	152/152/152/176/176/176/192/196	190/194/198/198	217x4
3	<i>A.baerii</i>	♀	197/225/225/245	264/272/272/280	122x2/126x2	152/156/163/168/176/176/176/176	190/190/198/198	217x4
	<i>A.ruthenus</i>	♂	213/253	252/252	130/0	164/176/176/188	186/186	217x2
4	<i>A.gueldenstaedtii</i>	♀	205/213/221/237	232/240/252/256	114/138	152x4/156/160/162/166	190x3/194	217x3/221
	<i>A.gueldenstaedtii</i>	♂	205/221/225/241	232/232/264/276	130/130	152x5/162/164/168	186/190x3	217x3/221
5	<i>A.ruthenus</i>	♀	221/229	248/252	130/130	152/152/168/168	190/0	217x2
	<i>H.huso</i>	♂	245/261	256/264	126/126	152/152/164/164	186/186	217x2
6	<i>A.stellatus</i>	♀	213/205	272/288	126/126	184/184/188/200	182/0	217x2
	<i>A.ruthenus</i>	♂	229/233	252/252	130/0	176/176/180/180	186/186	217x2
7	<i>A.stellatus</i>	♀	217/229	256/292	126/126	184/184/188/200	182/194	217x2
	<i>A.stellatus</i>	♂	205/229	288/288	126/126	184/184/184/188	194/194	217x2
8	<i>A.ruthenus</i>	♀	205/241	252/256	130/134	172/176/176/176	186/194	217x2
	<i>H.huso</i>	♂	229/237	156/160	126/126	164/164/168/172	190/190	217x2

Таблица S2. Наследование аллелей в локусе Afug51 в экспериментальных скрещиваниях

номер скрещ.	вид	пол	генотип	гаметы	набл	ожд 2x2n 1/2 3/4	ожд 2x2n 1/3 2/4	ожд 2x2n 1/4 2/3	ожд 4n	модель1 Chi ²	модель 2 и 3 Chi ²	Модель4 Chi ²
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	сибирский осетр ¹	самка	ABCD	AB	10	0	12	0	8	1,039E-286	0	0,604564
				AC	10	12	0	0	8			
			самец не участвует оплодотворение облученной спермой	AD	4	12	12	12	8	12	8	
				BC	8	12	12	12	8			
				BD	9	12	0	12	8			
				CD	6	0	12	12	8			
3	сибирский осетр ⁴	самка	ABBC	AB	28	20,5	20,5	41	27	0,018566	0	0,885941
93дет				AC	12	20,5	20,5	0	14			
				BB	16	20,5	20,5	0	14			
				BC	28	20,5	20,5	41	27			
				ABBC	9							
	стерлядь ⁵	самец	DD	D	93							

Таблица S3. Наследование аллелей в локусе AoxD165 в экспериментальных скрещиваниях

номер скрещ.	вид	пол	генотип	гаметы	набл	ожд 2x2n 1/2 3/4	ожд 2x2n 1/3 2/4	ожд 2x2n 1/4 2/3	ожд 4n	модель1 Chi ²	модель 2 и 3 Chi ²	Модель4 Chi ²
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
2	сибирский осетр2	самка	CDEF	CD	6	0	12	12	8	0	2,903E-203	0,251535
48 дет				CE	9	12	0	11	8			
				CF	5	11	11	0	8			
				DE	10	11	11	0	7			
				DF	4	12	0	11	7			
				EF	11	0	12	12	7			
				CDEF	2							
	сибирский осетр3	самец	AAAB	AB	19	24	24	24	24			
				AA	29	24	24	24	24			
3	сибирский осетр4	самка	ABCD	AB	16	0	22	22	15	0	0	0,774388
92 дет				AC	17	22	0	22	15			
				AD	12	23	23	0	15			
				BC	15	22	22	0	15			
				BD	12	23	0	23	15,5			
				CD	19	0	23	23	15,5			
				ABCD	2							
	стерлядь5	самец	EE	E	93	93	93	93	93			