

На правах рукописи



ГОЛОВАНОВА ТАТЬЯНА СЕРГЕЕВНА

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ БЕЛОРЫБИЦЫ И НЕЛЬМЫ
STENODUS LEUCICHTHYS (GÜLDENSTÄDT, 1772) В СВЯЗИ С ЗАДАЧАМИ
ИСКУССТВЕННОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА

03.00.10 - ИХТИОЛОГИЯ

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва- 2005

Работа выполнена в Межведомственной ихтиологической комиссии

Научный руководитель: доктор биологических наук
профессор
Никоноров Сергей Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
профессор
Решетников Юрий Степанович

доктор биологических наук
профессор
Илясов Юрий Иванович

Ведущая организация: Краснодарский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства (~~КрасНИИРХ~~)

Защита диссертации состоится «25» января 2005 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 307.003.01 при Федеральном Государственном Унитарном предприятии «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства» (ВНИИПРХ) по адресу: 141821, Московская обл., Дмитровский район, пос. Рыбное.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт пресноводного рыбного хозяйства».

Автореферат разослан « 25 » декабря 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Подоскина Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. Сиговые рыбы относятся к наиболее ценным промысловым видам внутренних водоемов и являются одним из основных объектов аквакультуры на большей части территории России.

Белорыбица и нельма относятся к виду *Stenodus leucichthys* (Güldenstädt, 1772), находящемуся под угрозой уничтожения и занесенному в Красную книгу России (Атлас пресноводных рыб России, 2002). Вместе с тем популяционно-генетические исследования этого вида в России охватывали небольшую часть популяций нельмы (Ермоленко, 1989; 1991; Ermolenko, 1992; Politov *et al*, 2000; Sendek, 2002), южный ареал вида - Каспийский бассейн, где обитает белорыбица - вообще не был исследован. Генетические исследования рыб сем. *Coregonidae*, проведенные с использованием различных методических подходов, не позволяют однозначно определить положение нельмы среди других видов семейства (Ermolenko, 1992; Bernatchez *et al.*, 1991; Lockwood *et al*, 1993; Saidak, Phillips, 1997; Hamada *et al*, 1998; Vuorinen *et al.*, 1998; Reist *et al*, 1998; Sendek, 2002), поэтому привлечение новых биохимических данных о неисследованных ранее популяциях поможет выяснить некоторые вопросы филогении, а также высказать предположения о путях расселении этого вида.

Так как ввиду зарегулирования стока Волги естественное воспроизводство стада белорыбицы затруднено, оно поддерживается в основном за счет искусственного разведения (Летичевский, 1983; Васильченко, 2002). В связи с этим, в целях правильного планирования и организации рыбоводства, необходимы исследования генетических процессов, сопровождающих формирование искусственно-природного стада белорыбицы в Волжском бассейне. Северо-европейские и сибирские стада нельмы являются уникальным резервом природных генофондов и могут стать объектами аквакультуры и пастбищного рыбоводства, в связи с чем необходимо исследование генетических характеристик и особенностей популяционной организации и микроэволюции вида *Stenodus leucichthys* в целом.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы состоит в том, чтобы с использованием методов изоферментного анализа и амплификации случайных последовательностей полиморфной ДНК (random amplified polymorphic DNA, RAPD -анализ) дать генетическое описание популяций нельмы Севера Евразии и белорыбицы с оценкой уровня внутривидовой дифференциации для организации генетического мониторинга.

Поставленная цель определила решение следующих задач:

- Выявить полиморфные и мономорфные ферментные локусы в популяциях белорыбицы и нельмы с помощью электрофоретического анализа, установить локусы, пригодные для внутривидовых сравнений белорыбицы и нельмы, а также для генетических мониторинговых работ.
- Исследовать молекулярно-генетические RAPD-маркеры, характеризующие ядерный геном у особей из популяций белорыбицы и нельмы. Определить RAPD-маркеры для дальнейшего проведения популяционно-генетического анализа.

- Исследовать генетические характеристики в выборках белорыбицы из нижнего течения и дельты р.Волга в течение длительного промежутка времени с 1987 по 2002 год. Провести генетический анализ выборок белорыбицы, отобранных в разные сроки анадромной миграции. Исследовать половую, возрастную и генерационную изменчивость белорыбицы по параметрам белкового полиморфизма.
- Количественно оценить уровни генетической дивергенции между популяциями в пределах вида и определить основные параметры генетической изменчивости для исследуемых популяций по аллозимным маркерам. Провести сравнительный анализ выборок из различных ареалов белорыбицы и нельмы с использованием RAPD-анализа.
- Провести анализ криоколлекции образцов тканей белорыбицы из Криобанка ВНИИПРХ с помощью аллозимного и RAPD-анализа.

Научная новизна.

Дано описание изменчивости по белковым локусам и молекулярно-генетическим RAPD-маркерам белорыбицы и нельмы из ряда водоемов Севера Евразии и Каспийского моря. Оригинальным является описание полиморфизма в локусе, кодирующем алкогольдегидрогеназу (*ADH**) у белорыбицы и нельмы, установление схемы его наследования на основе метода экспериментального гибридологического анализа. Выявлено влияние отбора по локусу алкогольдегидрогеназы, связанное с переменным преимуществом аллелей в процессе онтогенеза белорыбицы. Показана относительная стабильность генетических характеристик стада белорыбицы в пространственном и временном аспектах в течение периода 1987-2002 г. Предполагается, что гомогенность стада белорыбицы связана с особенностями искусственного воспроизводства. Приведены мультилокусные характеристики (23-25 генов) нескольких крупных локальных стад нельмы и белорыбицы Севера Евразии и Каспийского моря. Вычислены генетические расстояния (Nei, 1972) и оценены уровни дивергенции между популяционными комплексами нельмы и белорыбицы на основании данных изоферментного анализа. Представлено графическое отображение внутривидовой иерархической организации популяционных группировок белорыбицы и нельмы методом кластерного анализа признаков, отображающих полиморфизм ядерной ДНК (RAPD-маркеры). Оценено генетическое разнообразие белорыбицы из материалов Криобанка ВНИИПРХ и начато создание базы данных по мультилокусным генетическим маркерам данного вида.

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные данные дополняют представления о внутривидовой генетической структуре сиговых рыб и вносят вклад в решение проблемы сохранения биоразнообразия. Полученные в работе результаты являются важной составной частью генетического мониторинга рыбоводных процессов на заводах по воспроизводству белорыбицы в Каспийском бассейне, необходимого для успешного создания искусственно-природных стад. Характеристика генофонда природных стад нельмы может быть использована для научно-обоснованного осуществления ряда биотехнических мероприятий в аквакультуре и пастбищном ры-

боводстве. Проведен генетический анализ криоколлекции белорыбицы из материалов криобанка ВНИИПРХ, что служит основой для паспортизации базы данных по коллекциям белорыбицы и нельмы.

Апробация работы. Основные результаты выполненных исследований были представляемы на экологической научно-практической молодежной конференции «Проблемы изучения, охраны и рационального использования природных ресурсов Волго-Ахтубинской поймы реки Волги» (Астрахань, 1989), Первом Конгрессе ихтиологов России (Астрахань, 1997), Всероссийском симпозиуме «Возрастная и экологическая физиология рыб» (Борок, 1998), Международной конференции «Биологические ресурсы окраинных и внутренних морей России и их рациональное использование» (Ростов-на-Дону, 2000), Всероссийской конференции «Ранние этапы развития гидробионтов как основа формирования биопродуктивности и запасов промысловых видов в Мировом океане» (Москва, 2001), Научно-производственном совещании «Биология, биотехника разведения и промышленного выращивания сиговых рыб» (Тюмень, 2001), VIII Международном Симпозиуме по биологии и менеджменту сиговых рыб (Рованиemi, Финляндия, 2002), III(XXVI) Международной конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера» (Сыктывкар, 2003), Международном Симпозиуме «Холодноводная аквакультура - путь в XXI век» (С-Петербург, 2003), Международной конференции «Сохранение генетических ресурсов» (С-Петербург, 2004), XI Европейском Конгрессе ихтиологов (Таллинн, Эстония, 2004).

Благодарности. Автор искренне благодарит А.Абрамову, В.Барминцева, А.Волкова, Н.Варнавскую, В.Ефименко, И.Золина, Е.Зуянова, М.Кириченко, А.Матковского, А.Махрова, А.Новоселова, М.Офицерова, Д.Политова, Е.Пономареву, А.Пшенцова, Д.Сендек, И.Студенова, С.Титова, О.Чудинова, Д.Шабанову за помощь в сборе материалов и проведении исследований.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов и приложения. Список цитированной литературы содержит 365 источников, из них 295 на русском языке. Работа изложена на 235 страницах машинописного текста и иллюстрирована 43 рисунками и 12 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Белорыбица к нельма относятся к виду *Stenodus leucichthys* (Güldenstädt, 1772), роду *Stenodus* (Richardson, 1836), семейству сиговых (*Coregonidae*), подотряду лососевидных рыб (*Salmonoidei*) и отряду лососеобразных (*Salmoniformes*). В бассейне Каспийского моря обитает особый подвид - белорыбица *Stenodus leucichthys leucichthys* (Güldenstädt, 1772), другой подвид - нельма *Stenodus leucichthys nelma* (Pallas, 1773) - живет в реках Северного Ледовитого океана (Берг, 1948; Решетников, 1980; Атлас пресноводных рыб России, 2002). В озерах Кубенском и Зайсан (Титенков, 1953, 1955, 1961; Березовский, 1930; Смирнова, 1945), Новосибирском водохранилище и, возможно, реках Иртыш, Обь, Северная Сосьва, Анадырь, Енисей, Катунь, Бия, Тура,

Индибирка, Уса, Колва, Маккензи и др. нельма образовывала жилые формы (Меньшиков, 1935; Ягодников, 1953; Смольянов, 1957; Никонов, 1959; Петрова, 1976; Ку克林, Лопатин, 1983; Дмитриенко, 1985; Минеев, 1998; Новоселов, 2000; Туманов, 2000; Черешнев, 1996; Черешнев и др., 2000; Howland et al., 2000, 2001a,b).

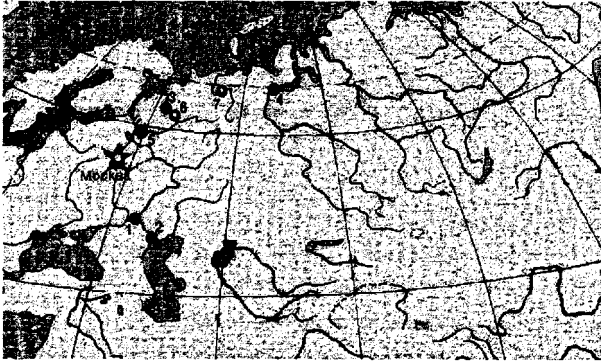
В данной главе приведены основные сведения по биологии нельмы и белорыбицы, обсуждены возможные пути расселения вида в прошлом и различные точки зрения о происхождении белорыбицы от северных популяций нельмы. В специальном разделе рассматриваются возможности использования нельмы и белорыбицы при искусственном разведении. Отмечено, что многие популяции нельмы и белорыбицы резко сокращают свою численность и переходят в разряд редких. Для предотвращения полного исчезновения нельма европейской части России внесена в «Красную книгу РФ» (2001). В «Красную книгу РФ» внесена и белорыбица (Уральская популяция). В Красной книге МСОП «IUCN Red List of threatened animals» (1996) белорыбица входит в число видов рыб, находящихся под угрозой исчезновения.

Глава 2. Материалы и методы.

Нами исследованы выборки из популяций нельмы рек Обь, Северная Двина и Печора, озера Кубенского и белорыбицы Каспийского моря. Материал собран и обработан в период с 1987 по 2003 г. Места взятия проб схематически изображены на рисунке 1. В таблицах 1 и 2 представлены данные по объемам выборок, кодам выборок и времени сбора первичного биологического материала.

Материал собирали во время экспедиций и полевых работ у нижнего бьефа плотины Волгоградской ГЭС в 1987, 1989, 1994, 1997 г., на Александровском осетровом рыбноводном заводе - в 1988, 1989, 2000, 2001, 2002, 2003 г., в Вологодской обл. - в 1998 г., в г.Салехард - в 1998 г., обрабатывали в лаборатории Александровского осетрового рыбноводного завода в 1988, 1989 г., в лаборатории Центрального производственно-акклиматизационного Управления - в 1989, 1990 г., в лабораториях Института общей генетики РАН - в 1987-2003, в лаборатории ГосНИОРХ - в 2002 г, в Центре молекулярно-генетической идентификации при Научном Органе СИТЕС (ВНИРО) - в 2000-2001 г. Сбор образцов тканей производителей белорыбицы для Криобанка ВНИИПРХ, с оценкой качества спермы, морфометрическим анализом, определением возраста рыб, осуществляли при проведении работ по криоконсервации спермы белорыбицы в ноябре 1994 и 1997 г. в районе плотины Волгоградской ГЭС.

Для проведения генетических исследований кусочки тканей рыб (печень, мышцы, сердце) фиксировали замораживанием, эти же пробы фиксировали в 94% этаноле для выделения ДНК. При проведении изоферментного анализа электрофорез проводили в полиакриламидных и крахмальных гелях. Для проведения электрофореза пробы тканей гомогенизировали в равном объеме 0.015 М буфера Tris-HCl pH=7.5 или в 0.05М Tris-HCl буфере, pH 8.0. с добавлением 0.2 г/мл сахарозы. Пробы центрифугировали 20 мин. при 12 тыс. об./мин.



1 - р. Волга (нижнее течение); 2 - дельта р. Волга; 3 - р. Северная Двина;
4 - р. Обь; 5 - оз. Кубенское; 6 - р. Северная Двина*; 7 - р. Печора

Рис. 1. Места сбора проб белорыбицы и нельмы, включенных в настоящее исследование.

Таблица 1.

Исследованные выборки из популяций нельмы и белорыбицы, коды выборок, объемы выборок и время сбора проб.

Подвид, географическая локальность	Код выборки	Годы	Объем выборки
А) Белорыбица <i>Stenodus leucichthys leucichthys</i> (Güldenstädt, 1772)			
1) р. Волга, нижнее течение	Casp1	1987	50
		1989	72
		1994	82
		1997	38
		1998	10
		1999	12
		2000	17
2) дельта р. Волга	Casp2	2001	31
		2002	4
В) Нельма <i>Stenodus leucichthys nelma</i> (Pallas, 1773)			
3) р. Северная Двина	NelSev.Dv	1998	12
		2000	17
		1998-1999*	20
4) р. Обь	NelOb	1998	32
5) оз. Кубенское	NelKub	1998	60
6) р. Печора	NelPech	1987	30
		1995-1998*	61

* - по данным Д. Сендек (Sendek, 2002).

Таблица 2.

Объемы исследованных выборок молоди белорыбицы, время сбора проб, места сбора проб и способы выращивания молоди.

№	Объем выборки	Год	Место сбора	Способ выращивания
1	248	1988	Александровский осетровый рыбоводный завод (АОРЗ)	Прудовой
2	1200	1988	АОРЗ	Бассейны Улановского, индивидуальные скрещивания
3	285	1989	АОРЗ	Прудовой
4	500	1990	Лаборатория Центрального производственно-акклиматизационного Управления	Аппараты Вейса, аквариум, индивидуальные скрещивания
5	50	2000	АОРЗ	Прудовой
6	100	2001	АОРЗ	Прудовой
7	50	2002	АОРЗ	Прудовой
8	60	2003	АОРЗ	Прудовой

Электрофорез белков в полиакриламидном геле проводили в аппарате конструкции Трувеллера и Нефедова (1974), а также в камерах конструкции Попелова (Кирпичников, 1979), согласно общим рекомендациям (Davis, 1964; Peacock et al., 1965). Плотность геля задавалась в зависимости от анализируемых локусов и используемой буферной системы (6,0-12,0%). В таблице 3 приведен список проанализированных ферментных локусов, их тканевой экспрессии и использованных для электрофореза буферных систем. Статистическая обработка полученных электрофоретических данных выполнена стандартными способами при помощи компьютерной программы BIOSYS-1 (Swofford, Selander, 1981). Гетерогенность выборок по частотам генов оценивалась по (Roff, Bentzen, 1989), с помощью компьютерной программы CHIRXC (Zaykin, Pudovkin, 1993). Для построения дендрограмм применен метод UPGMA-кластеризации по величинам генетических расстояний DN (Nei, 1972) с помощью компьютерной программы Статистика 6.0.

Метод полимеразной цепной реакции со случайными праймерами (RAPD-PCR) применяли для выявления мультилокусных маркёров сходства/различия образцов ДНК (в сумме 38) белорыбицы и нельмы (Williams et al, 1990). Для сравнительного анализа использовались образцы ДНК сига-нельмушки (*Coregonus lavaretus*) оз.Кубенского. RAPD-анализ был выполнен сотрудниками Центра молекулярно-генетической идентификации при Научном Органе СИТЕС (ВНИРО) при поддержке фонда «Региональный благотворительный фонд поддержки и пропаганды отечественного научного наследия».

Для выполнения RAPD-ПЦР использовали коммерческие праймеры фирмы "Оперон" (США): A-02 (5'-TGCCGAGCTG-3'); A-07 (5'-GAAACGGGTG-3'); A-09 (5'-GGGTAACGCC-3'); A-12 (5'-TCGGCGATAG-3'); A-20 (5'-GTTGCGATCC-3'); B-01 (5'-GTTTCGCTCC-3'); B-02 (5'-TGATCCCTGG-3'); B-05 (5'-TGCGCCCTTC-3'); K-20

(5'-GTGTCGCGAG-3') Реакцию проводили на термочиклере PTC-225 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) по программе: первичная денатурация: 94°C - 5 минут однократно; 36 рабочих циклов: 94°C - 30 секунд, 36°C - 30 секунд, 72°C - 1 минута; достройка: 72°C - 10 минут однократно. Электрофорез проводили в 6% полиакриламидном геле. В качестве стандарта длин фрагментов ДНК использовали ДНК фага λ (MBI Fermentas), рестрицированную эндонуклеазой PstI (MBI Fermentas). После завершения электрофореза гель окрашивали в водном растворе бромистого этидия ($1\mu\text{g/ml}$). Формирование библиотеки RAPD-профилей ДНК исследуемых образцов, оценку коэффициентов кросс-корреляции и коэффициентов генетических дистанций ДНК-фингерпринтов осуществляли с помощью программного обеспечения Phoretix ID Professionale (Nonlinear Dynamics) и визуально (RAPD-спектры анализировали по наличию (1) или отсутствию (0) полос в геле, соответствующих ампликонам различной длины).

Таблица 3.

Исследованные ферментные белки с числом исследованных локусов, их тканевой экспрессией и использованными буферными системами

Фермент	Код фермента	Локус	Ткань ¹	Буфер ²
Алкогольдегидрогеназа	1.1.1.1	<i>ADH*</i>	L	A
Аспартагминотрансфераза	2.6.1.1	<i>sAAT-1,2*</i>	M, H	A
Креатинкиназа	2.7.3.2	<i>CK-A1,2*</i>	M	A, D
Эстераза Д	3.1.-.-	<i>ESTD*</i>	M(L)	A
Эстераза	3.1.1..	<i>EST2*</i>	L	A
		<i>EST5*</i>	L	A
		<i>EST6*</i>	L	A
Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	1.1.1.8	<i>G3PDH-1*</i>	M	A
Глюкозо-6-фосфатизомераза	5.3.1.9	<i>GPI-A1*</i>	L	A, E
		<i>GPI-A2*</i>	M(L)	A, E
		<i>GPI-B1,2*</i>	M	A, E
L-Идитолдегидрогеназа	1.1.1.14	<i>IDDH-1,2*</i>	L	B, E
Изоцитратдегидрогеназа	1.1.1.42	<i>sIDHP-1,2*</i>	M	C, E
		<i>sIDHP-3,4*</i>	L	
Лактатдегидрогеназа	1.1.1.27	<i>LDH-A1,2*</i>	M	A, B
		<i>LDH-B1,2*</i>	M	A, B
Малатдегидрогеназа	1.1.1.37	<i>sMDH-A1,2*</i>	L	A
		<i>sMDH-B1,2*</i>	M	A
Малик-энзим	1.1.1.40	<i>mMEP-1,2*</i>	M	A
		<i>sMEP-3,4*</i>	L	A
Фосфоглюкомутаза	5.4.2.2	<i>PGM-3*</i>	L(M)	A, E
		<i>PGM-4*</i>	L	A, E
Фосфоглюконатдегидрогеназа	1.1.1.44	<i>PGDH*</i>	M	A, E
Супероксиддисмутаза	1.15.1.1	<i>sSOD*</i>	M(L)	A, E

¹ Ткань: M = скелетная мышца; L = печень; H - сердце

² Буфер: A = трис-EDTA-боратный pH 8.3 (TEB, Peacock et al, 1965); B = трис-цитрат/трис-боратный, pH=8,0/pH=9,0 (Cross and Ward, 1980); C = трис-цитрат/трис-цитратный, pH=7,1 (Shaw and Prasad, 1970),

D = трис-цитрат/LiOH-боратный, pH 8.5/8.1 (TBCL, Ridgeway et al., 1970);

E = аминопропилморфолин - EDTA - цитратный pH 7.2 (CAMG, Aebersold et al, 1987).

Жирным шрифтом отмечены локусы, используемые для межпопуляционных сопоставлений.

Построение дендрограмм генетического сходства выполнялось на основе рассчитанных коэффициентов кросс-корреляции индивидуальных фингерпринтов анализируемых особей и коэффициентов дистанций (Dice, 1945). На основе визуальных наблюдений были вычислены коэффициенты парного сходства между особями (S), расчет проводился по формуле: $S = 2F_y / (F_i + F_j)$, где F_y - количество одинаковых фрагментов у особей i и j , F_i - количество фрагментов, наблюдаемых у особи i , F_j - количество фрагментов, наблюдаемых у особи j . Для построения дендрограмм использовали методы: Neighbor-joining (NJ) method (Saitou, Nei, 1987), Unweighted neighbor-joining (UNJ) method (Gascuel et al., 1997) и UPGMA (unweighted pair-group average), программу Program T-REX, версия 2.0a1 (Makarenkov, 2001) и компьютерный пакет NTSYS (Rohlf, 1998).

Глава 3. Полиморфизм ферментных систем и молекулярно-генетических RAPD-маркеров у белорыбицы и нельмы.

Нами проанализировано 15 изоферментных систем, кодируемых 36 генетическими локусами. Инвариантны у всех исследованных особей креатинкиназа (*CK-A1.2**), эстераза-Д (*ESTD**), глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (*G3PDH-1**), лактатдегидрогеназа (*LDH-A1.2**; *LDH-B1.2**), супероксиддисмутаза (*SOD*), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (*PGDH*). Не выявлено полиморфизма в отдельных локусах многолокусных изозимных систем (*EST-2**; *GPI-A1**; *GPI-B1.2**; *IDHP-1,2**; *IDHP-3**; *MDH-A1.2**; *MDH-B2**; *mMEP-1,2**; *PGM-4**). Полиморфизм обнаружен в локусах *ADH**, *AAT-1,2**, *EST5**, *EST6**, *GPI-A2**, *JDDH-1,2**, *sIDHP-4**, *sMDH-B1**, *sMEP-3,4**, *PGM-3**. По двум локусам была найдена генетическая изменчивость с частотой редких аллелей, не превышающей 0.05 (*MDH-B1**; *PGM-3**). Полученные фенотипы в следующих локусах исследуемого вида соответствуют изменчивости обоих локусов *AAT-1,2** для белорыбицы и *sAAT-1,2**, *IDDH-1,2** для нельмы. Аллельные частоты для этих изолюкусов были приняты нами равными (Waples, 1988), в остальных случаях изменчивость приписывалась одному из двух локусов. Локусы *ADH**, *sAAT-1,2**, *sIDHP-4** и *IDDH-1** в популяции белорыбицы имели уникальные для вида аллели, локус *GPI-A2** в популяциях нельмы имел уникальный для вида аллель. У белорыбицы обнаружен полиморфный локус *ADH** и установлена схема его наследования на основе метода экспериментального гибридологического анализа, выявлены три аллеля в изолюкусах *AAT-1,2**, полиморфизм в локусах *MEP-3,4**, *EST-5**, *EST-6**. Для локуса *ADH**, генетическая вариабельность которого у вида ранее не описывалась, а также для локуса *IDDH-1**, в котором обнаружен уникальный для вида аллель, были предложены собственные обозначения аллелей.

Аmplификация тотальной ДНК белорыбицы и нельмы с использованием 9 праймеров позволила выявить спектр амплифицированных фрагментов (ампликонов), которые характеризовались различной степенью вариабельности. На рисунке 2 показан RAPD-спектр продуктов амплификации тотальной ДНК белорыбицы и нельмы с одним из праймеров (А-09).

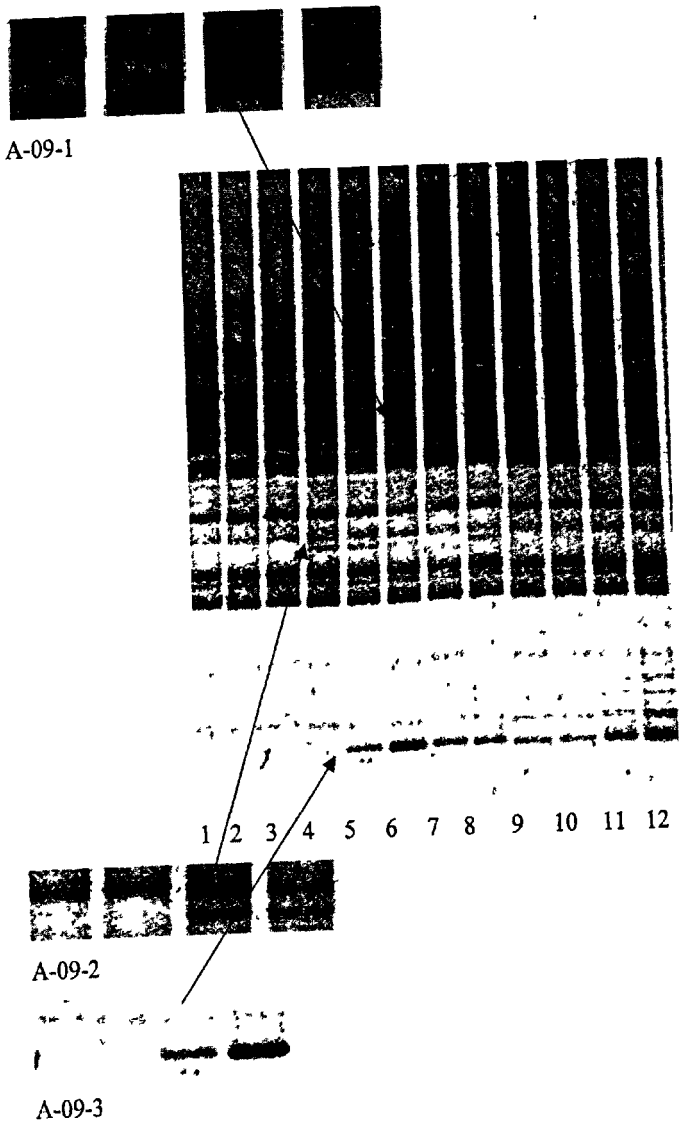


Рис. 2. RAPD-спектры продуктов амплификации totalной ДНК белорыбицы и нельмы с праймером А-09: 1-5- нельма, оз. Кубенское; 6-10- белорыбица, р.Волга , нижнее течение; 11-12 - нельма, р. Обь.

Исследованные нами RAPD-PCR спектры белорыбицы и нельмы состояли как из фрагментов, мономорфных для всех проанализированных выборок, так и полиморфных, имеющих различную частоту встречаемости среди различных популяций. В целом по изученным праймерам наблюдали больше 70% характерных для данного вида ампликонов. Визуально из 187 фрагментов нами выявлено 23 полиморфных ампликона, из которых 13 полиморфны в популяции белорыбицы (57%) и 15 - в популяциях нельмы (65%), из них всего 4 (17%) полиморфны во всех исследованных популяциях. Доля полиморфных фрагментов составляла для популяции белорыбицы - 7%, для популяций нельмы - 8%, из них 2% полиморфны во всех исследованных популяциях. Из популяций нельмы наиболее полиморфна нельма р.Обь: доля полиморфных фрагментов - 7.5%, для нельмы р.С.Двина - 5.3%; для нельмы оз.Кубенского - 3.7%. В популяции нельмы р.Обь полиморфны 60.1%, р.С.Двина - 43.5%, оз.Кубенского - 30.4% из всех полиморфных фрагментов.

Выявлен один ампликон, характеризующий популяции нельмы и дифференцирующий их от популяции белорыбицы, выявлены два ампликона, которые характерны для популяции белорыбицы и дифференцируют ее от популяций нельмы.

Глава 4. Генетический мониторинг популяции белорыбицы в бассейне р.Волга.

Производители белорыбицы, использованные в рыбоводном процессе в бассейне р.Волга, были объектами наблюдений за изменениями генетических характеристик (генетический мониторинг). Для мониторинга были выбраны наиболее полиморфные аллозимные локусы с частотой редких аллелей не менее 0.05. Нами исследовались алкогольдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, идитолдегидрогеназа печени и аспартатаминотрансфераза мышц (или сердца). В таблице 4 приведены аллельные частоты изученных полиморфных локусов в выборках производителей белорыбицы, собранных в нижнем течении и в дельте Волги (локальности 1 и 2 на рис.1), за период 1987-2002 г. Тест на гетерогенность (χ^2) показал отсутствие достоверных различий в генных частотах по локусам *ADH**, *IDHP-4**, *sIDDH-1** *AAT-1,2** в выборках материалов от производителей белорыбицы, собранных в разные годы, однако выявлены различия в гетерозиготности ($p < 0.01$). Результаты изоферментного анализа суммарных выборок белорыбицы, различающихся по времени сбора материала (март, ноябрь), сравнивали с использованием теста на гетерогенность (таблица 4). Полученные оценки свидетельствуют об однородности проанализированных выборок: ни по одному из исследованных локусов не было обнаружено статистически достоверных различий. Эти результаты подтверждают точку зрения МАЛетичевского (1960), что волжская белорыбца образует единое стадо с растянутым на несколько месяцев временем хода на нерест. При проведенном сравнении частот генов и гетерозиготности в выборках самцов и самок белорыбицы не обнаружено достоверных различий, хотя колебания параметров гетерозиготности по отдельным локусам *ADH**, *sIDDH-1** и *sIDHP-4** имели значительную величину.

При исследовании выборок, собранных в разные дни нерестового хода в ноябре в нижнем течении Волги, были выявлены достоверные различия аллельных частот в локусе *ADH**, отмечены колебания почти в 2 раза в значениях гетерозиготности по этому локусу. По локусу *ADH** у белорыбицы нами выявлено действие отбора, которое связано с переменным преимуществом аллелей в процессе онтогенеза (Серов и др., 1990; Голованова и др., 1998). По этому же локусу обнаружены значимые ($p < 0.05$) различия между выборками белорыбицы разного возраста. Генетическая неоднородность по времени подхода косяков белорыбицы на нерест в определенный сезон (ноябрь 1994 г.), обусловлена, видимо, неравномерностью подхода разных возрастных групп (Васильченко, 2002). Выявленную генетическую гетерогенность производителей белорыбицы необходимо учитывать при искусственном воспроизводстве. Так как нами не обнаружено статистически значимой гетерогенности по частотам исследуемых локусов между выборками производителей белорыбицы, собранными в разное время года и в разных локальностях, эти результаты могут свидетельствовать о том, что между локальными группировками белорыбицы в р.Волга существует значительное перемешивание, обусловленное процессом искусственного воспроизводства.

Постоянство генетических характеристик за более чем 15 лет наблюдений говорит о стабильном состоянии искусственно поддерживаемого стада белорыбицы в бассейне Волги.

В таблице 5 представлены частоты исследованных полиморфных локусов, ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность в выборках молоди белорыбицы, собранных в разные годы. Нами обнаружены достоверные различия в частотах аллели между выборками молоди белорыбицы различных генераций, выращенных на Александровском осетровом рыбоводном заводе. По исследованным локусам частоты аллелей в выборках молоди белорыбицы, собранных в 1988, 1989, 2000, 2001, 2002 и 2003 году, согласно тесту на гетерогенность различались при уровне значимости $p < 0.001$. Нами также обнаружены достоверные различия в гетерозиготности по исследованным аллозимным локусам между выборками молоди белорыбицы, собранными в разные годы. За последние годы в выборках молоди наблюдается тенденция к понижению одного из основных показателей генетической изменчивости - средней гетерозиготности (рис. 3).

Выявленную гетерогенность выборок молоди белорыбицы разных генераций мы объясняем ограниченным количеством производителей, использованных в производственном процессе в 2000 и 2001. В 2001г. нерестовое стадо белорыбицы формировалась, в основном, крайне малочисленными поколениями 1992 и 1993 гг., когда выпуск молоди составил 2,4 и 7,6 млн.экз. соответственно; в 1994 г. выпуск молоди вообще не производился, т.е. выпуск молоди в 1992-1994 гг. составил всего 10 млн.экз. (данные Севкаспрыбвода). В связи с резким снижением количества молоди, выпущенной в указанные годы, наблюдалось не менее резкое снижение захода производителей в Волгу в 2001г.

Таблица 4. Аллельные частоты полиморфных локусов, ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность и тест на гетерогенность выборки производителей белорыбиды, отловленных для воспроизводства в разные годы.

Локальность, сезон	Год	sIDHP-4*						ADH*				sAAT-1,2*			sIDDH-1*							
		N	*100 -a	*102 -b	108* -c	84* -f	H obs	H exp	N	*100 -a	*134 -b	H obs	H exp	N	*100 -a	85* -b	110* -c	N	100* -a	145* -b	H obs	H exp
Нижнее течение р Волга, ноябрь	1987	50	0 860	0 090	0 000	0 050	0 280	0 250	50	0 840	0 160	0 280	0 269	50	0 425	0 490	0 085	50	0 610	0 390	0 380	0 476
	1989	77	0 825	0 097	0 000	0 078	0 351	0 304	78	0 840	0 160	0 244	0 269	72	0 448	0 489	0 063	-	-	-	-	-
	1994	81	0 827	0 105	0 000	0 068	0 346	0 300	82	0 841	0 159	0 244	0 267	82	0 399	0 577	0 064	82	0 604	0 396	0 573	0 479
	1997	38	0 803	0 105	0 053	0 039	0 395	0 340	40	0 850	0 150	0 250	0 255	38	0 408	0 494	0 098	22	0 545	0 455	0 364	0 496
	1998	10	0 900	0 100	0 000	0 000	0 200	0 180	10	0 85	0 150	0 300	0 255	10	0 450	0 500	0 050	-	-	-	-	-
	1999	12	0 875	0 125	0 000	0 000	0 250	0 219	12	0 750	0 250	0 500	0 375	12	0 458	0 479	0 063	-	-	-	-	-
2000	6	0 917	0 083	0 000	0 000	0 167	0 153	6	0 917	0 083	0 167	0 153	7	0 429	0 536	0 036	-	-	-	-	-	
Суммарно (Casp1) 1987-2000		274	0 836	0 100	0 007	0 057	0 341	0 299	268	0 834	0 166	0 252	0 267	246	0 429	0 506	0 071	154	0 597	0 403	0 481	0 483
Тест на гетерогенность выборки (χ^2)	χ^2	6 14						6 73	4 53	2 04				8 51	2 19	2 78			0 58		12 09 ²	0 05
	D F	12						6	6	6				6	6	12			2		2	2
		Суммарно по частотам аллелей $\chi^2=14 32$ (D F=44)												Суммарно по H obs (без sAAT-1,2*) $\chi^2=27 43$ (D F=14) ¹								
Дельта р Волги, апрель	2001	19	0 842	0 105	0 026	0 026	0 316	0 278	21	0 810	0 190	0 381	0 308	21	0 369	0 560	0 071	18	0 611	0 389	0 444	0 495
Дельта р Волги, март	2001	10	0 850	0 100	0 000	0 050	0 300	0 265	10	0 800	0 200	0 400	0 320	10	0 400	0 525	0 075	10	0 600	0 400	0 400	0 480
	2002	4	1 000	0 000	0 000	0 000	0 000	0 000	4	0 875	0 125	0 250	0 219	4	0 625	0 375	0 000	-	-	-	-	-
Суммарно (Casp2) 2001-2002		33	0 864	0 091	0 015	0 030	0 310	0 274	35	0 814	0 186	0 387	0 317	35	0 407	0 529	0 064	28	0 607	0 393	0 429	0 486
Тест на гетерогенность выборки (χ^2)	χ^2	6 10						3 43	3 02	0 22				0 59	0 11	2 47			0 01		0 11	0 00
	D F	5						2	2	2				2	2	4			1		1	1
		Суммарно по частотам аллелей $\chi^2=11 29$ (D F=16)												Суммарно по H obs (без sAAT-1,2*) $\chi^2=4 13$ (D F=5)								
Сравнение суммарных выборок из дельты и нижнего течения р Волга по частотам аллелей		$\chi^2=2 3$ (D F=9)																				

Примечание ¹- $p < 0,05$, ²- $p < 0,01$, N – количество проанализированных особей, H obs - наблюдаемая гетерозиготность, H exp - ожидаемая гетерозиготность

Таблица 5. Аллельные частоты полиморфных локусов, ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность и тест на гетерогенность выборок молоди белорыбицы, выращенной на Александровском острове рыбноводном заводе в разные годы.

Год	sIDHP-4*							ADH*				sAAT-1,2*			sIDDH-1*						
	N	*100 -a	*102 -b	108* -c	84* f	H obs	H exp	N	*100 -a	*134 -b	H obs	H exp	N	*100 -a	85* -b	110* -c	N	100* -a	145* -b	H obs	H
1988	30	0 867	0 100	0 000	0 033	0 267	0 238	248	0 819	0 181	0 306	0 297	23	0 500	0 435	0 065	-	-	-	-	-
1989	101	0 832	0 099	0 000	0 069	0 337	0 294	174	0 813	0 187	0 282	0 304	285	0 424	0 476	0 100	101	0 609	0 391	0 485	0 476
2000	30	0 850	0 100	0 000	0 050	0 300	0 265	35	0 857	0 143	0 286	0 245	24	0 458	0 479	0 063	-	-	-	-	-
2001	73	0 904	0 075	0 000	0 021	0 192	0 176	90	0 961	0 039	0 078	0 075	66	0 405	0 530	0 065	-	-	-	-	-
2002	25	0 640	0 000	0 360	0 000	0 400	0 461	29	0 914	0 086	0 034	0 158	32	0 625	0 375	0 000	25	0 620	0 380	0 440	0 471
2003	60	0 842	0 083	0 025	0 050	0 317	0 282	60	0 850	0 150	0 300	0 255	60	0 458	0 479	0 063	61	0 689	0 311	0 361	0 429
Тест на	χ^2	68 88 ¹					12 33 ¹	16 45 ²	26 26 ³		54 67 ¹		42 19 ¹	19 33 ¹			2 15		4 78	0 82	
про-	D F	10					5	5	5		5		5	10			2		2	2	
ность		Суммарно по частотам аллелей										$\chi^2 = 116 62 (D F = 27)^1$									
борок (χ^2)		Суммарно по H obs (без sAAT-1,2*)										$\chi^2 = 71 78 (D F = 12)^3$									

Примечание ¹ - $p < 0 05$, ² - $p < 0 01$, ³ - $p < 0 001$
 N – количество проанализированных особей
 H_{obs} - наблюдаемая гетерозиготность
 H_{exp} - ожидаемая гетерозиготность

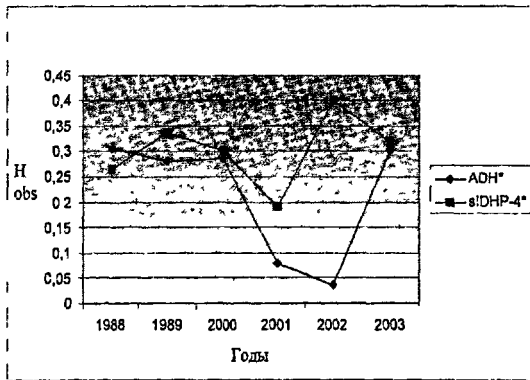


Рис. 3. Наблюдаемая гетерозиготность по некоторым полиморфным локусам в выборках молоди белорыбицы, выпускаемой с Александровского рыбоводного завода в разные годы.

Снижение генетического разнообразия у молоди белорыбицы выпуска 2001 и 2002 г. не повторилось в 2003 г., когда для искусственного воспроизводства использовалось более 100 производителей, поэтому мы считаем, что это количество производителей минимально необходимо для искусственного воспроизводства белорыбицы.

Глава 5. Исследование внутри- и межпопуляционной изменчивости белорыбицы и нельмы с использованием изоферментных и ДНК-маркеров

5.1. Генетическая дифференциация популяций и параметры генетической изменчивости белорыбицы и нельмы по данным изоферментного анализа

Для внутривидовых сопоставлений природных популяций нельмы и искусственно поддерживаемой популяции белорыбицы нами учитывались частоты генов по результатам биохимической обработки 23 - 25 изоферментных локусов (таблица 3). Для исследованных выборок белорыбицы и нельмы были рассчитаны основные параметры генетической изменчивости - величины уровня полиморфизма (P) и средней ожидаемой гетерозиготности (Y_{exp}) (таблица 6).

Уровень полиморфизма ($P_{0,99}$ 17.4-18.5), средняя гетерозиготность ($H=0.048-0.076$) и среднее число аллелей на локус (1.18-1.26) у нельмы и белорыбицы имели сходные показатели. Рассчитанные по 23 локусам генетические расстояния между исследуемыми популяциями белорыбицы и нельмы (Nei, 1972) варьировали от 0.0001 до 0.0360, по 25 локусам, с учетом *sAAT-1,2**, но для меньшего количества популяций, от 0.0001 до 0.0390. Генетические расстояния между выборками белорыбицы, взятыми в разных географических локальностях, очень мало: $DN=0.0001$.

Таблица 6

Уровень полиморфизма, среднее число аллелей на локус и средняя ожидаемая гетерозиготность в популяциях нельмы и белорыбицы (по 23 локусам)

Выборка	P_{99} (%) ¹	P_{95} (%) ²	Среднее число аллелей на локус	H_{exp} ³
Белорыбица (р Волга нижнее течение) – <i>Casp1</i>	21 74	13 04	1 30 (0 15)	0 049 (0 026)
Белорыбица (Дельта р Волга) – <i>Casp2</i>	13 04	13 04	1 22 (0 14)	0 045 (0 026)
Средние величины для белорыбицы	17 39	13 04	1 26	0 048
Нельма (р Северная Двина) <i>NelSDv</i>	17 39	17 39	1 17 (0 08)	0 080 (0 037)
Нельма (р Обь) <i>NelOb</i>	21 74	17 39	1 26 (0 11)	0 072 (0 033)
Нельма (оз Кубенское) <i>NelKub</i>	17 39	17 39	1 17 (0 08)	0 079 (0 037)
Нельма* (р Северная Двина) <i>NelSDv1*</i>	17 39	17 39	1 17 (0 08)	0 081 (0 038)
Нельма* (р Печора) <i>NelPech*</i>	17 39	17 39	1 17 (0 08)	0 068 (0 032)
Средние величины для нельмы	18 48	17 39	1 18	0 076

¹Локус считается полиморфным, если частота основного аллеля не превышает 0 99

²Локус считается полиморфным, если частота основного аллеля не превышает 0 95

³Приводятся только величины средней ожидаемой гетерозиготности H_{exp} , т к нет возможности определить генотипы в случае полиморфизма обоих изолюкусов

* - с привлечением данных Д Сендек (Serdek, 2002) В скобках приводится стандартная ошибка

Выявленные уровни генетической дифференциации между популяциями нельмы одного бассейна, а также между популяционными системами разных бассейнов в общем хорошо согласуются с соответствующими оценками, полученными для многих других видов (Осипов, 1984; Pohtov et al., 2000, Sendek, 2002, Politov et al, 2002) Низкий уровень генетической дивергенции между популяциями нельмы р Северная Двина, Печора и Обь, оз Кубенского ($DN=0 0006-0 0115$) может быть объяснен сравнительно недавним геномным обменом, который мог происходить между восточно-европейскими и восточно-сибирскими популяциями Возможно, происходил контакт ихтиофаун из Сибири и Восточной Европы во время последнего оледенения.

Таблица 7.

Генетические расстояния D_N (Nei, 1972) между популяциями белорыбицы и нельмы, рассчитанные по 23 локусам

Генетические расстояния, D_N (Nei, 1972)							
Код выборки	<i>Casp1</i>	<i>Casp2</i>	<i>NelSDv</i>	<i>NelOb</i>	<i>NelKub</i>	<i>NelSDv1*</i>	<i>NelPech*</i>
<i>Casp1</i>	0						
<i>Casp2</i>	0 0001	0					
<i>NelSDv</i>	0 0323	0 0322	0				
<i>NelOb</i>	0 0322	0 0323	0 0022	0			
<i>NelKub</i>	0 0360	0 0359	0 0010	0 0046	0		
<i>NelSDv1*</i>	0 0329	0 0328	0 0006	0 0049	0 0006	0	
<i>NelPech*</i>	0 0309	0 0310	0 0058	0 0056	0 0115	0 0083	0

* с привлечением данных Д Сендек (Serdek, 2002) Обозначения выборок из таблицы 1

Низкий уровень генетической дивергенции между популяциями нельмы оз.Кубенского и р.Северная Двина ($D_N=0.0006-0.0010$) можно объяснить сравнительно недавним разделением этих двух популяций (в 1843 г. на р. Сухоне была построена плотина) и наличием генного обмена между ними. Раньше нельма проходила из р.Северная Двина по р. Сухоне в оз.Кубенское, в притоках которого происходил нерест. Средний уровень гетерозиготности у жилой нельмы оз.Кубенского и нельмы р.С Двина не различаются, что также говорит в пользу совсем недавнего генного обмена между этими двумя популяциями.

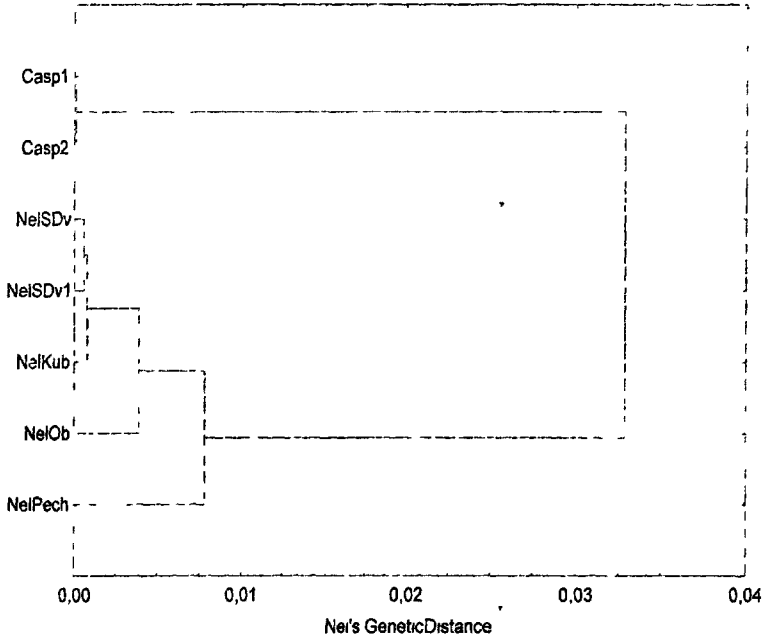


Рис. 4. Дендрограмма генетических расстояний (Nei, 1972) для популяций белорыбицы и нельмы по 23 ферментным локусам. Обозначения выборок из таблицы 1.

Полученные данные показаны на рис.4 в виде дендрограммы генетических расстояний (Nei, 1972) для популяций белорыбицы и нельмы по 23 ферментным локусам. Полученная картина в целом логично объясняет различия между популяциями. На дендрограмме мы видим два кластера. Белорыбица образует отдельный кластер, причем две выборки, взятые в разных географических локальностях, находятся рядом ($D_N=0.0001$). Нельма из оз. Кубенское образует единый кластер с нельмой р.Северная Двина, нельма р.Обь занимает промежуточное положение между нельмой р.Печора и кластером, образованным нельмой оз.Кубенского и нельмой р. Северная Двина. Нельма р.Печора из

всех исследованных популяций нельмы по полученному генетическому расстоянию ближе к белорыбце, что может свидетельствовать в пользу предположения о контактах двух подвидов именно в этой речной системе (Подлесный, 1941, 1947).

Показатели генетического разнообразия исследованных выборок белорыбцы и нельмы приведены в таблице 8. Показатели F_{ST} для нельмы и белорыбцы различны. Доля генетического разнообразия, приходящегося на различия между выборками нельмы, выше, чем доля, приходящаяся на различия между выборками белорыбцы, взятыми в разных локальностях и в разное время хода на нерест. Доля генетического разнообразия, приходящегося на различия между выборками нельмы р.Северная Двина и оз.Кубенское ($F_{ST}=0.0032$), гораздо ниже, чем доля, приходящаяся на различия между выборками нельмы р.Обь и р.Печора ($F_{ST}=0.1294$). Средний уровень генетической миграции $N_e m$, оцененный на основе стандартизированных генетических вариантов по аллозимным локусам (1-10), в среднем соответствует таковым, отмеченным для лососевых и сиговых видов рыб.

Таблица 8.

Показатели генетического разнообразия для белорыбцы и нельмы (по полиморфным локусам)

Группа	F_{ST}	$N_e m$
Все популяции	0.1720	10
Нельма	0 0398	6
Белорыбца	0 0081	1
Нельма р С.-Двина, нельма оз Кубенское	0 0032	1
Нельма р Обь, нельма р Печора	0.1294	8

F_{ST} — доля межпопуляционного разнообразия в тотальном

$N_e m$ — число мигрантов на поколение

Выделение на дендрограммах белорыбцы в отдельный кластер указывает на большую дивергенцию этого подвида. Белорыбца наиболее генетически удалена от остальных исследованных популяций вида. Эти различия мы относим за счет дивергенции этой популяции в локусах ADH^* , $sAAT-1,2^*$, $IDDH-1,2^*$, $IDHP-4^*$.

5.2. Применение метода RAPD-PCR для анализа внутривидовой изменчивости белорыбцы и нельмы

Средние коэффициенты генетического сходства, рассчитанные для групп белорыбцы (I) и нельмы (II) по 187 фрагментам RAPD (A-02, A-07, A-09, A-12, A-20, B-01, B02, B05, K20), достоверно отличаются от среднего коэффициента генетического сходства для всех изученных особей белорыбцы и нельмы (таблица 9).

Частоты встречаемости каждого из исследуемых фрагментов в пределах групп белорыбцы и нельмы были рассчитаны для двух исследуемых регионов (р.Волга и бассейн р.Северная Двина). Среднее генетическое разнообразие H_{ex} рассчитано из частот фрагментов RAPD, включая мономорфные.

Среднее генетическое разнообразие *Hexp* внутри групп белорыбицы ($Hexp = 0.0267$) и нельмы ($Hexp = 0.0226$) по изученным RAPD-маркерам оказалось примерно одинаковым, среднее же генетическое разнообразие ($Hexp = 0.0555$) для всех исследованных образцов белорыбицы и нельмы почти в два раза превышает среднее генетическое разнообразие внутри групп.

Таблица 9.

Средние коэффициенты попарного сходства между особями для изученных групп белорыбицы и нельмы, рассчитанные по 187 фрагментам RAPD (A-02, A-07, A-09, A-12, A-20, B-01, B02, B05, K20).

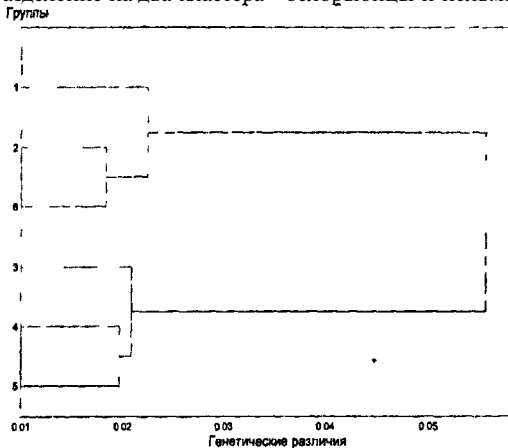
Группа	$S (M \pm m)$	$Hexp$
Группа I	0.9832 ± 0.0013	0.0267
Группа II	0.9859 ± 0.0008	0.0226
Группа I и группа II	0.9670 ± 0.0008	0.0555

Примечание I — белорыбица 2000 г, р Волга, нижнее течение (образцы 6-10) и белорыбица 2000 г, дельта р Волга (образцы 19-23), II — нельма оз Кубенское (образцы 11-15) и нельма р С Двина (образцы 24-28)

S - коэффициент попарного сходства между особями

$Hexp$ - ожидаемый уровень гетерозиготности, является мерой тотального разнообразия

Анализ матрицы средних значений коэффициента попарного сходства между группами образцов белорыбицы и нельмы (праймеры A-12, A-20, B-1, B-2, B-5) и построенная по ним дендрограмма (по 118 фрагментам RAPD) показали также четкое разделение на два кластера - белорыбицы и нельмы (рис.5).



1-S

Рис. 5. Дендрограмма сходства/различия (UPGMA) между группами образцов белорыбицы и нельмы по 118 фрагментам RAPD (праймеры A-12, A-20, B-1, B-2, B-5).

1-я группа - образцы 6-10 (белорыбица 2000 г, р Волга, нижнее течение), 2-я группа - образцы 19-23 (белорыбица 2000 г, дельта р Волга), 3-я группа - образцы 11-15 (нельма оз Кубенское), 4-я группа - образцы 24-28 (нельма р С Двина), 5-я группа - образцы 31-35 (нельма р Обь), 6-я группа - образцы 41-45 (белорыбица 1994 г, р Волга, нижнее течение), S - коэффициент попарного сходства между особями

Дендрограммы, построенные по результатам RAPD-анализа и изоферментного анализа, сходны и демонстрируют генетические различия между изучаемыми подвидами белорыбицы и нельмы.

RAPD-спектры ДНК исследуемых образцов были также проанализированы с помощью программного обеспечения Phoretix ID Advanced (Nonlinear Dynamics). Наиболее информативным оказался праймер В-01. Для межвидовых сравнений с помощью этого праймера, кроме RAPD профилей исследуемых особей из популяций белорыбицы и нельмы, были получены RAPD профили сига-нельмушки оз.Кубенского. Дендрограмма RAPD-профилей с использованием праймера В-01 особей белорыбицы, нельмы и сига-нельмушки, построенная по методу объединения ближайших соседей (UNJ) на основе коэффициентов попарного сходства (Dice, 1945) разделила все исследуемые выборки образцов на отдельные кластеры, выявила различия между группами образцов белорыбицы, собранными в разные периоды хода на нерест (выборки Casp1 и Casp2), различия между образцами, собранными в разные годы (выборки Casp1, Casp2 и Casp3), различия между популяциями нельмы р.С.Двина и оз.Кубенское (рис.6). Отметим, что при межвидовом сравнении нельмы, белорыбицы и сига-нельмушки оз.Кубенское средние коэффициенты попарного сходства (Dice, 1945) между особями (0.29-0.61) примерно в два раза меньше, чем при внутривидовом сравнении белорыбицы и нельмы (0.64-0.98).

Выполненный сравнительный молекулярно-генетический анализ образцов из четырех популяций белорыбицы и нельмы показал, что дендрограммы UPGMA и NJ, построенные с использованием разного количества исследованных фрагментов RAPD, дифференцируют особей белорыбицы и нельмы по разным кластерам. Наши данные согласуются с генетическими исследованиями, выполненными методом изоферментного анализа, и не противоречат представлению о белорыбице и нельме как подвидах или географических расах. Образцы нельмы оз.Кубенского объединяются в единый кластер с образцами нельмы из р.Северная Двина, что указывает на сравнительно недавний контакт между этими двумя популяциями, в то же время при кластеризации RAPD - профилей, полученных с использованием праймера В-01, образцы нельмы оз.Кубенского и р.Северная Двина разделяются на разные кластеры, что свидетельствует о генетической подразделенности этих двух популяций. Анализ дендрограммы по 118 фрагментам RAPD обнаруживает близость части образцов нельмы оз.Кубенского и р.С.Двина с образцами нельмы р.Обь, что подтверждает точку зрения о контактах нельмы из разных речных бассейнов. Одновременно на дендрограмме с использованием праймера В-01 образцы нельмы р. Обь образуют обособленный кластер, что можно объяснить более длительной генетической изоляцией этой популяции. По результатам RAPD-анализа выявлены различия между выборками образцов белорыбицы, собранными в разные годы и в разные периоды хода на нерест (праймер В-01). Продемонстрирована высокая эффективность применения RAPD-анализа для исследования структуры популяций белорыбицы и нельмы.

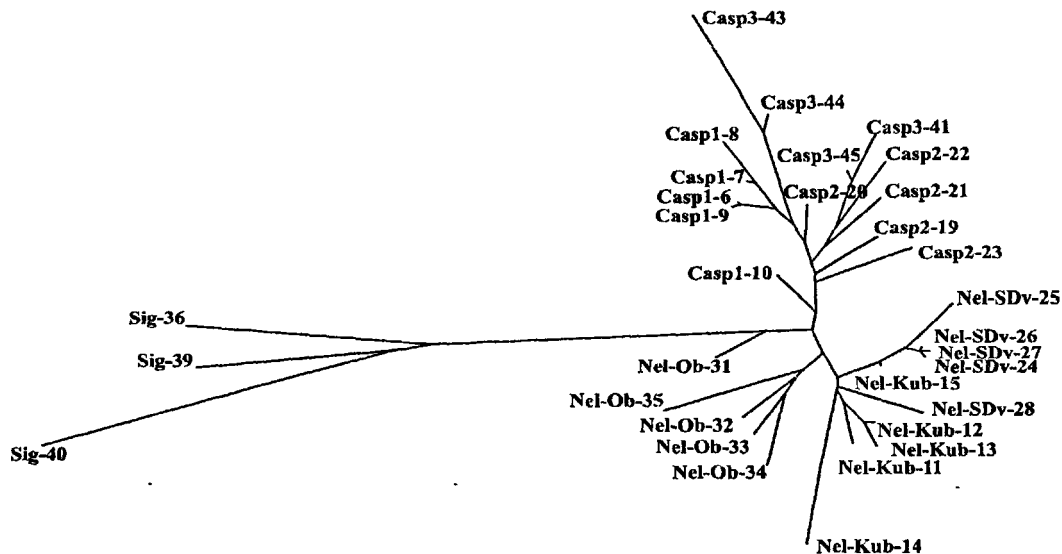


Рис 6. Дендрограмма RAPD-профилей с использованием праймера В-01 особей белорыбицы, нельмы и сига-нельмушки, построенная по методу объединения ближайших соседей (UNJ) на основе коэффициентов попарного сходства (Dice, 1945).

Обозначения выборок: Casp1- белорыбица р. Волга, нижнее течение, ноябрь 2000 (образцы 6-10); Casp2 - белорыбица дельта р. Волга, март 2000 г. (образцы 19-23); Casp3- белорыбица р. Волга, нижнее течение, ноябрь 1994 г. (образцы 41-45); Nel-SDv- нельма р.С.Двина (образцы 24-28); Nel-Kub-нельма оз.Кубенское (образцы 11-15); Nel-Ob - нельма р.Обь (образцы 31-35), Sig-сиг-нельмушка оз.Кубенское (образцы 36,39,40).

Результаты RAPD-анализа показывают достаточно высокую степень близости исследованных образцов белорыбицы и нельмы. Вместе с тем нужно отметить, что средние коэффициенты генетического сходства выше между особями их разных речных бассейнов в Северном регионе, чем между особями Северного и Южного регионов, что может рассматриваться в пользу того, что период генетической изоляции популяции белорыбицы по отношению к северным популяциям нельмы имеет большую продолжительность, чем у северных популяций между собой. Это предположение согласуется с выводами, полученными из результатов изоферментного анализа этих популяций.

Глава 6. Генетический анализ образцов тканей белорыбицы из криоколлекции ВНИИПРХ

В 1994 г. методом электрофореза проанализирован 31 ферментный локус, экспрессирующийся в мышцах или печени у производителей белорыбицы, в 1997 г. - 35 ферментных локусов. Четыре полиморфные ферментные системы были выбраны для проведения мониторинговых работ: изоцитратдегидрогеназа (*SIDHP-3,4**), аспаратаминотрансфераза (*sAAT-1,2**), алкогольдегидрогеназа (*ADH**) и идитолдегидрогеназа (*IDDH-1,2**). По выбранным маркерам были исследованы образцы тканей от 61 самца, сперма которых заложена в криобанк в 1994 году, в 1997 г. обработаны образцы тканей от 36 особей.

Данные изоферментного анализа показали, что выборка образцов белорыбицы в криобанке (сбор 1994 г.) отражает основной генотипический состав популяции (таблица 4), содержит образцы с редкими аллелями и генотипами.

При анализе криоколлекции методом RAPD-PCR общее число исследованных фрагментов равно 157. Для выборки образцов, хранящихся в криобанке и для выборки образцов тканей белорыбицы, нерестившейся в 2000 году, рассчитанные коэффициенты парного сходства (S) оказались очень близки - 0.9829 ± 0.0024 и 0.9760 ± 0.0021 , между группами - 0.9798 ± 0.0012 . При проведении кластерного анализа (UPGMA) образцы разных лет подразделяются на отдельные кластеры с высокой степенью близости исследованных выборок. Дендрограмма (UNJ), на основании RAPD-анализа с использованием праймера В-01, выявила различия между группами образцов белорыбицы, собранными в разные периоды хода на нерест. На дендрограммах эти образцы подразделяются на разные кластеры, что означает разнокачественность исследованных выборок. Поэтому при дальнейшем формировании криоколлекции белорыбицы криоконсервация и использование при осеменении икры спермы от самцов белорыбицы, выловленных в разные периоды нерестового хода, а также криоконсервированных препаратов спермы, заготовленных в предыдущие годы, даст возможность использовать половые продукты от генетически разнокачественных группировок для поддержания генетического разнообразия этого уникального объекта искусственного воспроизводства и аквакультуры.

Полученные результаты пригодны для формирования и обеспечения генетического раздела информационной базы данных в фондах системы низкотемпературных банков и криохранилищ, для решения научных и практических

проблем совершенствования биотехнологий аквакультуры и сохранения био-разнообразия.

На основании изложенного материала можно дать следующие практические рекомендации

При создании на рыбоводных предприятиях маточных стад белорыбицы и нельмы, для получения высококачественного рыбопосадочного материала, как для целей воспроизводства, так и для реализации, необходим постоянный генетический контроль в форме мониторинга. Процесс доместикиции белорыбицы и нельмы необходимо корректировать отбором, направленностью которого должна определяться целью дальнейшего выращивания производителей (воспроизводство для пополнения природных популяций, товарное выращивание). Выявленные генетические признаки могут применяться в качестве маркеров для исследования особенностей рыбоводного процесса.

Использовать при выращивании молоди нельмы и белорыбицы в индустриальных рыбоводных хозяйствах производителей местных популяций, т.к. товарное выращивание необходимо совмещать с выпуском молоди в естественные водоемы в целях воспроизводства. Генетический мониторинг природных популяций необходим в связи со снижением численности популяций нельмы и важностью определения оптимальных вариантов по стандарту выпускаемой молоди.

Выводы

1. Методом электрофореза в полиакриламидных и крахмальных гелях исследовано 15 ферментных систем у белорыбицы и нельмы и выявлено 36 кодирующих их генов. Полиморфизм обнаружен в локусах *ADH**, *AAT-1,2**, *EST5**, *EST6**, *GPI-A2**, *IDDH-1,2**, *sIDHP-4**, *sMDH-B1**, *sMEP-3,4**, *PGM-3**.

2. Анализ признаков, характеризующих ядерную ДНК с использованием 9 праймеров, позволил выявить 187 фрагментов RAPD у белорыбицы и нельмы. Показано, что 23 полиморфных фрагмента могут быть использованы для проведения популяционно-генетического анализа. Выявлен один ампликон, характеризующий популяции нельмы и два ампликона, характеризующие популяцию белорыбицы, которые в дальнейшем могут быть использованы для дифференциации популяций.

3. Исследование генетических характеристик в выборках белорыбицы из нижнего течения и дельты Волги за период с 1987 по 2002 год показало отсутствие достоверной гетерогенности в пространственном и временном аспектах. Исключение составляют некоторые выборки, отобранные в разные сроки анадромной миграции, которые достоверно отличались по частотам аллельных локусов. Результаты генетического мониторинга свидетельствуют о стабильном состоянии поддерживаемого искусственно стада белорыбицы в бассейне Волги. Выявлено действие отбора по локусу *ADH** у белорыбицы, которое связано с переменным преимуществом аллелей в процессе онтогенеза. Показано, что генетическая неоднородность выборок молоди белорыбицы различных поколений связана с ограниченным количеством производителей, использованных для искусственного воспроизводства.

4. Анализ параметров генетической изменчивости по аллозимным локусам показал, что уровень полиморфизма ($P_{0,99} = 17.4-18.5$) и средняя гетерозиготность ($H = 0.048-0.072$) у нельмы и белорыбицы имели сходные показатели. Исследования природных популяционных комплексов нельмы Северной Евразии и белорыбицы показали наличие достоверной гетерогенности как по частотам аллозимных локусов, так и по индексам генетического сходства спектров фрагментов ядерной ДНК. Кластерный анализ генетических расстояний D_N (Nei, 1972) по частотам аллозимных локусов и генетических различий, вычисленных по спектру фрагментов RAPD (Dice, 1945), показал хорошее соответствие уровня генетической дивергенции географическому положению исследованных популяций. Значения генетической дивергенции между подвидами ($D_N = 0.032-0.038$) по сравнению со значениями генетической дивергенции между популяциями нельмы ($D_N = 0.000-0.010$) указывают на более тесные контакты между популяционными комплексами нельмы. Средний уровень генетической миграции (оцененный по аллозимным локусам) в целом соответствует таковому, отмеченному для лососевых и сиговых видов рыб.

5. Данные аллозимного анализа криоколлекции белорыбицы из Криобанка ВНИИПРХ показали, что выборка образцов в криобанке отражает основной генотипический состав популяции белорыбицы и содержит образцы с редкими аллелями и генотипами. Полученные данные по составу RAPD-спектров образцов белорыбицы, хранящихся в Криобанке, служат основой для паспортизации базы данных по генетическим характеристикам криоколлекции белорыбицы и нельмы.

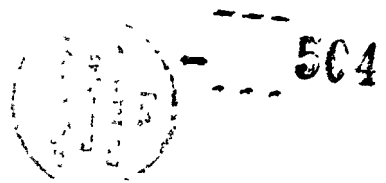
По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Голованова Т.С. 1989. Электрофоретический анализ некоторых ферментных систем белорыбицы, воспроизводимой на Александровском осетровом рыбноводном заводе в дельте Волги // Проблемы изучения, охраны и рационального использования природных ресурсов Волго-Ахтубинской поймы реки Волги: Тезисы докладов экологической научно-практической молодежной конференции. Астрахань. С.107-108.
2. Офицеров М.В., Витвицкая Л.В., Никоноров С.И., Голованова Т.С. 1989. Влияние заводского выращивания на генетическое разнообразие атлантического лосося *Salmo Salar* // Вопросы ихтиологии. Т.29. Вып 5. С.871-874.
3. Серов Д.В., Голованова Т.С., Никоноров С.И. 1990. Анализ генетического отбора на ранних этапах онтогенеза на примере полиморфной системы АДГ белорыбицы // ДАН СССР. Т. 311. № 2. С. 484-487.
4. Голованова Т.С., Варнавская Н.В., Мальдов Д.Г., Никоноров С.И. 1997а. Изучение генетической изменчивости белорыбицы, воспроизводимой на Александровском осетровом рыбноводном заводе в дельте Волги // Первый Конгресс ихтиологов России. М.: ВНИРО. С.351.
5. Голованова Т.С., Варнавская Н.В., Мальдов Д.Г., Никоноров С.И. 1997б. Полиморфизм изоцитратдегидрогеназы (ИДГ) и аспаратаминотрансферазы (ААТ) белорыбицы по результатам скрещиваний // Первый Конгресс ихтиологов России. М.: ВНИРО. С. 350.
6. Голованова Т.С., Серов Д.В., Никоноров С.И., Мальдов Д.Г., Витвицкая Л.В. 1997в. Изучение причин отбора по локусу аякогальдегидрогеназы на ранних стадиях онтогенеза у белорыбицы при искусственном воспроизводстве // Первый Конгресс ихтиологов России. М.: ВНИРО С. 308.

7. Ананьев В.И., Андреев А.А., Голованова Т.С., Петропавлов Н.Н., Цветкова Л.И. 1998. Опыт криоконсервации спермы белорыбицы и белуги // Рыбное хозяйство. Серия Аквакультура, «Проблемы сохранения геномов лососевых и осетровых рыб». Вып. 1. С.25-32.
8. Голованова Т.С., Никоноров СИ., Мальдов Д.Г., Городовская С.В. 1998. Различная выживаемость самцов белорыбицы *Stenodus leucichthys* Guld. с определенными генотипами по локусу алкогольдегидрогеназы на ранних стадиях онтогенеза//Возрастная и экологическая физиология рыб: Тезисы докладов Всероссийского симпозиума. Борок. С 28-29.
9. Голованова Т.С., Мальдов Д.Г., Новоселов А.П., Никоноров СИ. 2000. Аллозимная изменчивость белорыбицы и нельмы *Stenodus leucichthys* //Вопросы рыболовства. Т.1.№2.С.95-96.
10. Голованова Т.С., Никоноров СИ. 2001. Формирование изменчивости по длине тела у потомства от индивидуальных скрещиваний производителей белорыбицы (*Stenodus leucichthys Guld*) на ранних стадиях онтогенеза// Вопросы рыболовства. П.1. С 60-62.
11. Голованова Т.С., Никоноров СИ., Новоселов А.П., Барминцев В.А. 2001. Применение RAPD-PCR-анализа для изучения внутривидовой изменчивости белорыбицы и нельмы (*Stenodus leucichthys*). II Биология, биотехника разведения и промышленного выращивания сиговых рыб: Материалы научно-производственного совещания. Тюмень. С.37-41.
12. Никоноров СИ., Ананьев В.И., Голованова Т.С. 2001. Проблемы искусственного воспроизводства белорыбицы и сохранения ее генетического разнообразия с применением крио технологий // Биология, биотехника разведения и промышленного выращивания сиговых рыб: Материалы научно-производственного совещания. Тюмень. С. 113-118.
13. Golovanova T.S., Zujjanov E.A., Nikonorov S.I. 2002. Intraspecific genetic variation of Caspian inconnu (*Stenodus leucichthys* Guld.) and nelma (*Stenodus leucichthys nelma* (Pallas) assessed by allozyme analysis// VIII International Symposium on the Biology and Management of Coregonid Fishes. 26-29.8.2002, Finland, Rovaniemi, Poster abstracts. P. 16.
14. Голованова Т.С. Никоноров СИ., Чудинов О.С., Абрамова А.Б. 2003. Исследование внутри- и межпопуляционной изменчивости нельмы и белорыбицы (*Stenodus leucichthys*) методом RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)// Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Материалы III(XXVI) Международной конференции. Сыктывкар. С26.
15. Голованова Т.С., Ананьев В.И., Никоноров СИ., Цветкова Л.И., Петропавлов Н.Н., Барминцев В.А. 2003. Анализ криоколлекции белорыбицы (*Stenodus leucichthys leucichthys* Guld.) с помощью изоферментного и RAPD-анализа // Холодноводная аквакультура - путь в XXI век: Материалы Международного симпозиума. С-Петербург. С.138-139.
16. Голованова Т.С., Никоноров СИ., Ананьев В.И., Цветкова Л.И., Волков А.А., Барминцев В.А. 2004. Молекулярно-генетические аспекты формирования криоколлекции белорыбицы (*Stenodus leucichthys Guld.*)// Цитология.Т.46. № 9. С.782-783.
17. Golovanova T.S., Nikonorov S.I. 2004. The long-term genetic monitoring of allozyme variation in the artificially reproduced Caspian inconnu, *Stenodus leucichthys leucichthys* (Güldenstädt, 1772) //XI European Congress of Ichthyology. September 6-10, 2004, Tallin, Estonia. Estonian Marine Institute Report Series. No.12. P.168-169.

Подписано к печати 10.12.2004г.
Формат 60х90, объем 1 п.л.
Тираж 120 экз. Заказ № 151

312



504

16 DEC 2005