

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ

Кафедра экологии и генетики

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор
Пак И. В.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

магистра

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГИБРИДОВ СИБИРСКОГО ОСЕТРА И СТЕРЛЯДИ
РЕКИ ИРТЫШ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

06.04.01 Биология

Магистерская программа «Экологическая генетика»

Выполнила работу
студентка 2 курса
очной формы обучения

Воробьева Анастасия Викторовна

Научный руководитель
д.б.н., доцент

Жигилева Оксана Николаевна

Рецензент
д.б.н., доцент,
профессор кафедры зоологии и
эволюционной экологии животных
ТюмГУ

Селюков Александр Германович

Тюмень

2020

АННОТАЦИЯ

С. 50, табл. 10, рис. 2, библиограф. 74, прил. 5.

Представлены данные о биологии сибирского осетра *Acipenser baerii* Brandt, 1869 и стерляди *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758, описаны особенности их филогеографии и филогенетики. Для изучения генетического разнообразия естественных популяций этих видов и идентификации особей, полученных вследствие межвидовой гибридизации, использованы молекулярно-генетические маркеры на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Дана оценка уровней генетической изменчивости стерляди и сибирского осетра из р.Иртыш. Путем изучения изменчивости участка контрольного региона митохондриальной ДНК установлена гибридная природа атипичных особей стерляди. Выявлены участки видоспецифичных ISSR-локусов гибридов для поиска корреляции с исходными видами.

Ключевые слова: осетровые рыбы, межвидовые гибриды, естественная гибридизация, полиморфизм, мтДНК, ПЦР-диагностика.

ANNOTATION

The data on the biology of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt, 1869 and the sterlet *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758, are presented. Features of their phylogeography and phylogenetics are described. To study genetic diversity of natural populations of these species and identification of individuals, which are obtained as a result of interspecific hybridization, molecular genetic markers based on the polymerase chain reaction (PCR) method were used. The assessment of genetic variability of sterlet and Siberian sturgeon from the Irtysh River was done. The hybrid origin of the atypical specimens of sterlet was installed by studying the variability of a section of the control region of mitochondrial DNA. The species-specific ISSR-bands were identified in the hybrids to find a correlation with the parental species.

Keywords: sturgeon fish, interspecific hybrids, natural hybridization, polymorphism, mtDNA, PCR diagnostics.

ОГЛАВЛЕНИЕ

АННОТАЦИЯ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1.ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ ОСЕТРОВЫХ РЫБ	8
1.2.ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОСЕТРОВЫХ РЫБ	11
1.2.1.ПРОМЫСЛОВОЕ ЗНАЧЕНИЕ	11
1.2.2.ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОСЕТРОВЫХ РЫБ В АКВАКУЛЬТУРЕ.....	12
1.2.3.ОСЕТРОВЫЕ КАК БИОИНДИКАТОРЫ	13
1.3.ЕСТЕСТВЕННАЯ И ИСКУССТВЕННАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ	14
1.4.МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ	16
1.5.ТИПЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ГЕНЕТИКИ РЫБ	20
1.6.МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНЕТИКА И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1.ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	24
2.2.ФИЗИКО-ГЕОГРАФИЧЕСАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	25
2.3. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	26
3.1.ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГИБРИДОВ СТРЕЛЯДИ И СИБИРСКОГО ОСЕТРА ПО МАРКЕРАМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК	29

3.2.СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТЕРЛЯДИ И СИБИРСКОГО ОСЕТРА РЕКИ ИРТЫШ ПО ISSR-МАРКЕРАМ.....	30
3.3.СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТЕРЛЯДИ И СИБИРСКОГО ОСЕТРА РЕКИ ИРТЫШ ПО ИЗОФЕРМЕНТАМ.....	31
ВЫВОДЫ.....	37
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	38
ПРИЛОЖЕНИЯ 1-5	46

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мтДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота.

ПЦР (англ. PCR) – полимеразная цепная реакция.

AFLP-маркеры – (англ. amplified fragment length polymorphism) – маркеры полиморфизма длин амплифицированных фрагментов ДНК.

ISSR (англ. inter simple Sequence repeats) – простые повторяющиеся последовательности.

ISSR-маркеры – маркеры, основанные на межмикросателитных последовательностях.

RAPD (англ. random amplified polymorphic DNA) – случайно амплифицируемая полиморфная ДНК.

RFLP (англ. restrictions fragment length polymorphism) – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

ВВЕДЕНИЕ

Осетроводство в России становится одной из важнейших отраслей сельского хозяйства, с каждым годом наращивая свои объемы. Искусственное воспроизводство позволяет компенсировать ущербы всем биоресурсам и проводить мероприятия по воспроизводству и переселению в места обитания. Основным из наиболее перспективных путей повышения эффективности стад за счет контроля уровня изменчивости популяции и расчета результатов скрещивания межвидовых особей является использование генетико-популяционных методов.

Известно достаточно примеров естественной гибридизации рыб, что является основой прогресса – генетической изменчивости признаков. Таким образом, тема межвидовых взаимоотношений гидробионтов остается открытой, а вопросы их экологии и биологии достаточно актуальными [Багиров и др., 2009, с. 55; Павлов и др., с. 109].

Современным подходом изучения генетического разнообразия популяции и особей, полученных вследствие межвидовой гибридизации, является идентификация особей при помощи молекулярных маркеров. Их полиморфизм исследуется для дальнейшей разработки программ по сохранению генетических ресурсов осетровых рыб. Анализ генофондов с использованием генетических маркеров показывает особенности молекулярно-генетической структуры и необходимости разработки методов сохранения генетического биоразнообразия редких и исчезающих видов рыб [Пелеева и др., с. 27; Комарова и др., с. 349; Залоило и др., с.55].

Практическое значение изучения осетровых рыб, это появление гетерозиса у межвидовых гибридов, проявляющегося в ускоренном росте, повышенной жизнестойкости, ранним наступлении половой зрелости, по сравнению с отдельными видами [Кривошеин и др., с. 18]. Поэтому в ближайшее время важнейшая задача – это повышение продуктивности и объема воспроизводства

осетровых рыб, что будет способствовать снижению промысла естественных популяций [Гадинов и др., с. 143].

Цель данной работы – изучить генетические особенности гибридов сибирского осетра и стерляди.

Для выполнения поставленной цели были сформулированы задачи:

1. Идентифицировать родительские формы атипичных особей стерляди на основании анализа изменчивости контрольного региона митохондриальной ДНК;
2. Описать полиморфизм родительских видов и гибридов сибирского осетра и стерляди при помощи мультилокусных ДНК-маркеров;
3. Сравнить генетические показатели гибридов и исходных видов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Осетровые ведут свое начало с мезозоя, частично распространены в водоемах северного полушария. Это семейство играет важнейшую промысловую роль [Шедько и др., с.2013].

Осетровые – весьма примитивная группа рыб, у которых имеется несколько примитивных черт в развитии. Все виды осетровых имеют относительно сходный внешний облик и общий план строения [Волосников, Алдохин, с. 92]. На туловище есть пять рядов жучек – костных ромбических пластин, которые считаются рудиментом ганоидных чешуй. На верхней лопасти хвостового плавника сохраняются фулькры – ганоидные чешуи. Настоящие кости только накладные на хрящевом черепе, внутренний скелет по большей части хрящевой. В непарных плавниках большое число лучей, которых иногда больше числа скелетных элементов.

В отряд осетровые входят веслоносые (*Polyodontidae*) и осетровые (*Acipenseridae*). К осетровым относятся полупроходные, туводные и проходные рыбы [Козлов, Абрамович, с. 46,48].

Сибирский осетр (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) широко распространен во всех крупных реках Сибири от Оби до Колымы, а также оз. Байкал [Ходоревская, с.75]. У него темно-серая окраска туловища и бледно-серое брюшко. Конец рыла серый, нижняя часть белая. Тело веретенообразное с продольными рядами. Рыло короткое, треугольной формы. Длина тела 80—120 см, массой тела 8-15 кг. Имеются 4 округлых усика на нижней поверхности головы. В спинном ряду 12-19 жучек, а в боковых рядах по 9-15 жучек. От окончания рыла до верхнего свода рта посредине рыла имеются прерывистые «кораллообразные» морфологические структуры, относящиеся к провизорным системам и отсутствующие у взрослых особей. Возможно, эти структуры относятся к проявлению атавизма в раннем онтогенезе сибирского осетра (приложение 1).

Размножение происходит на песчано-галечных и галечниковых грунтах при скорости течения воды 2-4 км/ч, на глубине 4-8м. Созревают самцы в возрасте 9 лет, а самки – 9-12 лет. Периодичность нереста для самцов составляет раз в три года, самки же нерестятся раз в 5 лет. Максимальная продолжительность жизни 50 лет.

Сибирский осетр питается личинками поденок и личинками хирономид, ручейники и гаммариды, ракообразными (амфиподами), а также некоторой молодью рыб, личинками миног. Осетровые по типу питания бентофаги заглатывают пищу вместе с грунтом.

Зимой осетры залегают в ямы при температуре воды около $+8^{\circ}$ на глубине 10-40 метров. В Оби они расположены у нового порта вне северной границы обских заморов, в Иртыше – близ устья, в районе г. Тобольска. Нерестилища обского осетра расположены на большом протяжении реки, но в основном у устья реки Оби, также существуют нерестилища в низовьях Оби. Размножение осетра происходит в конце мая – июне при температуре воды от 12 до 18 $^{\circ}\text{C}$. Нерестовая миграция начинается в апреле еще до полного очищения рек ото льда и продолжается до середины июня. Температура воды в этот период изменяется с 3-5 до 14-15 $^{\circ}\text{C}$. Плодовитость сибирского осетра в Оби 9-24 тыс. шт., а в Иртыше – 7-17 тыс. шт. [Власов и др., с. 87; Михайлов, Женихова, с. 13].

Сибирский, русский и амурский осетры по цитогенетическим исследованиям в диплоидном наборе имеют около 250 хромосом. Данные, основанные на анализе ДНК, свидетельствуют о том, что эти виды являются тетраплоидами в функциональном отношении [Кузьмин, Кузьмина, с.1090].

Стерлядь (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) – пресноводная рыба, но может заходить в слабосоленые воды. Считается, что стерлядь имеет самое широкое распространение. Обитает в реках Волга и Дон, но самое большое ее распространение в реках Оби и Енисее, где она представлена подвидом – сибирская стерлядь (*Acipenser ruthenus marsiglii* Brandt, 1833).

Стерлядь – один из самых небольших видов осетровых, средний вес составляет 2-4 кг, некоторые особи достигают массы 6-7 кг, длина составляет от

15-55 см, но средняя длина 30-35 см. Морфологические признаки стерляди: прерванная нижняя губа, бахромчатые усики и большое количество жучек: боковых – от 56 до 71, спинных – от 11 до 18, брюшных – от 10 до 20 штук. В спинном плавнике у нее насчитывается от 32 до 49 лучей, в анальном – от 16 до 34 лучей. Усики, расположенные на нижней части головы, бахромчатые. Рот небольших размеров расположен на нижней стороне головы, нижняя губа прервана. Окрас в области спины от темно-серого до серовато-коричневого, постепенно становится светлее на боках и в области брюха меняется до серовато-белого; плавники серые. Внутри вида выделяют острорылые и тупорылые формы (более редкая) (приложение 2). Половозрелости достигают самцы к 3-7 годам, самки – к 4-12. Максимальная продолжительность жизни составляет 20 лет, может достигать максимума 30 лет.

В зависимости от географической широты нерест начинается с апреля по июнь. Глубина нерестилищ от 7 до 15 м, 10–15 °С – оптимальная температура для нереста. Плодовитость составляет от 5-100 тыс. икринок. Весной при вскрытии льда стерлядь поднимается с зимовальных ям, где проводит всю зиму, не питаясь в малоподвижном состоянии еще с осени. Зимовальная яма – это участок реки с резким перепадом глубин, в акватории ям постоянно наблюдаются суводи (водовороты), такие участки реки играют значительную роль в сохранении различных видов рыб, в том числе и ценных. Начинается ее массовый ход к местам нереста или нагула. После нереста стерлядь расходится по залитой пойме Иртыша, где она интенсивно питается зообентосом: личинками мошек, поденок, моллюсков, хирономид, а также моллюсками, резе червями и икрой других рыб. У стерляди 120 хромосом [Волосников, 2017, с.70; Пономарев, с.128,133,147; Власов и др., с.91; Третьякова, с.142; Либерман, с. 85].

Основными экологическими факторами, влияющими на жизнедеятельность, как сибирского осетра, так и стерляди, являются: водные сооружения, преграждающие пути миграции, устаревшие правила рыболовческой деятельности, конкурентные взаимоотношения с лещом за места

нагула в русловой зоне, так как спектр питания леща схож со спектром питания осетровых [Волосников, с. 67].

1.2. ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

1.2.1. ПРОМЫСЛОВОЕ ЗНАЧЕНИЕ

На бассейн Каспийского моря приходится до 90% улова осетровых [Привезенцев и др., с.10], особенно, его часть – Волго-Каспийский бассейн является одним из самых больших по численности осетровых рыб водоемов. Из 26 известных видов осетровых здесь обитают 6: белуга (*Huso huso*), русский осетр (*Acipenser güldenstädtii*), персидский осетр (*Acipenser persicus*), севрюга (*Acipenser stellatus*), стерлядь (*Acipenser ruthenus*), шип (*Acipenser nudiventris*). Белуга промыслового значения не имеет в связи с общим снижением численности и биомассы популяции и ухудшением качества нерестовой структуры; также введен запрет на русского осетра, севрюгу, шипа, которые внесены в Красную книгу [Ходоревская и др., с.100].

Осетровые причислены к вымирающим видам уже к концу XX века, основная причина – это неадекватный вылов, так как рыба особенно ценная, но обладающая слабой репродуктивной способностью. Также способствовала хозяйственная деятельность, вследствие которой произошло сокращение нерестовых территорий [Мюге и др., с.48].

Сибирский осетр и сибирская стерлядь обитают в реках Сибири, а также озере Байкал, в котором в свое время происходил ощутимый вылов. Максимальный вылов сибирского осетра достигал 1700 т. в год. В разные годы его вылов на Оби достигал 1410 т. (1935 г.), на Енисее – 500 т. (1934 г.), Лене – 190 т. (1943 г.), на Байкале – 215 т. (1939 г.). На данный период времени официальный промысел сибирского осетра возможен лишь в Лене, где добывают 22-23 т. Обская и байкальская популяции сибирского осетра занесены в Красную книгу РФ, а промысел осетра в Енисее запрещен. Запрет на промысел сибирского

осетра действует также и на других реках Сибири, таких как Яна, Индигирка, Колыма и другие, где его численность всегда была невысока.

Факторы, вызвавшие сокращение популяции осетра Обь-Иртышского бассейна, были:

- 1) интенсивное загрязнение Обь-Иртышского бассейна в результате добычи нефти и газа, деятельности предприятий химической и нефтехимической промышленности, а также оборонного комплекса, развития речного транспорта;
- 2) нерациональный промысел;
- 3) строительство плотины Новосибирской ГЭС, отрезавшей 40% нерестилищ, расположенных выше;
- 4) уничтожение нерестилищ в результате гидростроительства.

Еще три вида – сахалинский осетр, амурский осетр и калуга, обитают на Дальнем Востоке. Наибольшее промысловое значение имеет калуга и амурский осетр, так как они более многочисленны, а сахалинский осетр – чрезвычайно редкий вид. В настоящее время улов амурского осетра и калуги составляет 58,8 и 72,7 т, соответственно [Рубан и др., с. 42-43].

1.2.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОСЕТРОВЫХ РЫБ В АКВАКУЛЬТУРЕ

Осетроводство в России с каждым годом приобретает все больший масштаб как одна из важнейших отраслей сельского хозяйства. Искусственное воспроизводство позволяет компенсировать ущербы водным биоресурсам и проводить мероприятия по реконструкции осетровых. Стерлядь (*Acipenser ruthenus* L.) — один из наиболее широко распространенных представителей осетровых в России с длительной эволюционной историей [Комарова и др., с.349].

В аквакультуре сибирского осетра ленского и обского происхождения на сегодняшний день произошло резкое падение гаплотипического разнообразия. Основная масса аквакультурных особей несет два мажорных гаплотипа, характерных для европейской части России ("ленская" аквакультура), и два

гаплотипа, свойственных западной части Сибири ("обская" аквакультура). По результатам микросателлитного анализа в аквакультуре осетра ленского происхождения выделяются два генетических кластера, один из которых представлен стадами, вследствие имбредности поголовья характеризующимися падением аллельного разнообразия и исчезновением редких аллелей [Барминцева и др., с. 2107].

Первые детальные исследования экологии и физиологии показывают высокую адаптивную пластичность, ряд особенностей биоэнергетики и химического состава тела, что лежит в основе биологического прогресса этих форм [Павлов, Скибин, с. 150; Гершанович и др., с. 131]. Для выращивания осетровых рыб необходимо два основных фактора массонакопления: полноценность рациона и оптимальная температура воды. У них также имеются генетически закрепленные адаптации, посредством которых эти рыбы достаточно пластичны к условиям среды и быстро растут (проходные виды и их гибриды) [Пономарев и др., с. 78].

Число скатывающихся личинок определяет величину возврата, а по остатку, величина коэффициентов от заводской молоди, количество которой не превышает 1-2 % процентов. До сих пор не удалось провести достоверных исследований, которые определяли бы коэффициент промыслового возврата от молоди к искусственной генерации [Кокоза, с.105].

1.2.3.ОСЕТРОВЫЕ КАК БИОИНДИКАТОРЫ

Осетровые являются ценнейшими представителями рыб, в настоящее время они являются больше не пищевыми ресурсами, а скорее биоиндикатором состояния водной среды бассейнов рек и морей. Именно эта систематическая группа является зонтичным видом в качестве критерия классической теории бассейновой концепции устойчивости для развития и сохранения всех иных наземных и водных видов [Лагутов, с. 129].

Осетровые как биоиндикаторы чувствительны к высоким концентрациям нитратов, углекислого газа, перепадам рН, а также актуальным для Обь-Иртышского бассейна загрязнителем окружающей среды от предприятий нефтехимической и химической промышленности. В таких неблагоприятных условиях жизнедеятельности сокращается их численность и размерно-весовые характеристики возрастных групп сибирского осетра [Казарникова и др., с. 52; Курбатский и др., с. 120].

1.3.ЕСТЕСТВЕННАЯ И ИСКУССТВЕННАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

В Оби и Енисее хорошо известна помесь сибирского осетра и сибирской стерляди (так называемая «костерь») [Баранов, с.89]. Естественные помеси осетровых были давно известны, их впервые описал Л. С. Берг в своей книге «Пресноводные рыбы СССР и сопредельных стран». Описаны несколько комбинаций естественных гибридов:

Huso dauricus x *Acipenser schrenckii* (калуга x амурский осетр)

Huso huso x *Acipenser nudiventris* (белуга x шип)

Huso huso x *Acipenser gueldenstaedtii* (белуга x русский осетр)

Huso huso x *Acipenser stellatus* (белуга x севрюга)

Acipenser nudiventris x *Acipenser stellatus* (шип x севрюга)

Acipenser ruthenus x *Acipenser gueldenstaedtii* (стерлядь x русский осетр)

Acipenser ruthenus x *Acipenser stellatus* (стерлядь x севрюга)

Acipenser gueldenstaedtii x *Acipenser stellatus* (русский осетр x севрюга)

Acipenser baerii x *Acipenser ruthenus* (сибирский осетр x стерлядь) [Берг, с.101].

Осетровых рыб широко используют при искусственной межвидовой гибридизации, так как они имеют высокие адаптивные возможности и темпы роста. При гибридизации рыб возникает соматический гетерозис, что является желаемым результатом [Новосадов, с.21]. Простые гибриды имеют более

высокую жизнестойкость. Большой интерес представляет анализ соотношения различных свойств семейств уже имеющихся гибридов, т.е. выявить и описать характер зависимости интересующих нас биологических параметров гибридных особей от других характеристик этого же пула гибридов [Паренский и др., с. 231]. При скрещивании видов разного филогенеза адаптивно более пластичны гибриды, нежели чистые виды. При переводе в новую среду обитания, способствующее их направленной изменчивости видовых адаптаций [Бурцев, с. 21].

Большой уровень морфологической изменчивости осетровых рыб и их гибридов говорит об их высоких адаптивных возможностях [Романов, Скирин, с.290]. Для расширения возможности механизмов адаптации популяции, включающей гибридов, используются различные подходы, основанные на методах популяционной генетики, генетики количественных признаков и молекулярной биологии [Топчиков, Федоренко, с. 30-31].

Идентификация гибридов рыб особенно актуальна и встречается заметно чаще, чем у других позвоночных. Она необходима для сохранения видов и сертификации качества продукции, произведенной из осетровых рыб [Рожков и др., с. 1460].

Необходимо особо выделить, что ряд осетровых гибридов стерильны. Гибриды между видами с разной ploидностью (диплоиды и тетраплоиды) являются стерильными триплоидами. Они обладают большей продуктивностью в связи с присущим им гетерозисом. К такому гибриду относится и генотип стерляди и ленского осетра, он обладает высокими хозяйственными показателями. В качестве отцовской особи используется ленский осетр, а материнской – стерлядь. Основными преимуществами полученного гибрида являются быстрый рост и стерильность, способствующая сохранению высокой интенсивности роста в течение ряда лет, приспособленность к выращиванию на теплой сбросной воде с широким температурным диапазоном [Кривошеин, с. 15, Буровцев, с. 13].

1.4.МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Уникальность и высокая коммерческая ценность реликтовой группы осетровых рыб стимулировали исследования их генетического полиморфизма. [Тимошкина и др., с.15]. Выявление полиморфизма гибридов ПЦР- методом позволяет установить специфичность спектра ампликонов, в случае использования определенного праймера. Расшифровка ДНК позволяет выявить участки геноспецифичных локусов, что в свою очередь полезно для поиска корреляции качественных и количественных признаков [Мариуца, с. 45]. При проведении исследований выяснили, что в ходе эволюции осетровых рыб не было изменений хромосом в численном порядке. Осетровых выделяет то, что они обладают относительно большим набором хромосом. Эти факторы в купе с перекрываемой зоной нереста дают возможность для межвидовой гибридизации. В связи с этим, эта группа рыб является достаточно интересной для изучения и сохранения в природе [Рожкован, с. 11].

Изучение генетических особенностей осетровых является важнейшей задачей, так как эти животные находятся под сильным антропогенным воздействием [Никоноров, Ветвицкая, с. 68].

Проблемно-ориентированные и прикладные исследования направлены на идентификацию и исследование селекционно-значимых полиморфизмов, ассоциированных с количественными и качественными показателями продуктивности, использование методов геномной паспортизации, позволяющих определять на геномном уровне племенную ценность животных; на разработку новых биотехнологических подходов к селекции и выращиванию осетровых, основанных на методах ДНК-технологии и ПЦР-анализа [Базелюк и др., с. 23].

Для некоторых рыб, также как для других систематических групп животных, наблюдается на ранних стадиях онтогенеза дефицит гетерозигот по самым различным полиморфным локусам, которые в последующем онтогенезе

исчезают, а затем, как правило, сменяется повышенным уровнем гетерозиготности [Никоноров, Ветвицкая, с. 201].

Современные методы биотехнологии позволяют увеличивать темпы роста рыб, таким образом, повышая их устойчивость к инфекционным агентам, влиять на репродуктивные процессы, получая улучшенные гибриды [Барминцева, Мюге, с. 355].

Технология микро- и минисателлитной ДНК широко применяется в последнее время и дает возможность выявить не только межвидовые и породные различия, но и индивидуальный полиморфизм на уровне ДНК. Статистика некоторых популяционно-генетических параметров существующих генофондов популяций позволяет разработать стратегию разведения. За основу отбора особей по их высокой адаптивной ценности желаемого фенотипа, в качестве родителей, чтобы они могли передавать необходимые гены потомству в последующих поколениях.

Управление и распространение тех или иных генов в генофонде указывает на наиболее целесообразные воздействия на генофонд для его улучшения, изменения направления факторов, которые помогают определить признаки, выгодные в хозяйственном значении [Власов и др., с. 87].

Исследования природного генетического полиморфизма сибирского осетра имеет непосредственное значение для разработки мер по охране и восстановлению природных популяций этого вида, так и для развития аквакультуры [Ходоревская, с. 80].

Изучение полиморфизма молекулярно-генетических маркеров — обязательный этап разработки программ по сохранению генетических ресурсов осетровых рыб. Анализ генофондов с использованием молекулярно-генетических маркеров свидетельствует о выраженных особенностях генетической структуры и необходимости дальнейшей разработки генетически обоснованных методов сохранения биоразнообразия редких видов рыб.

Один из методов для изучения генетического разнообразия популяций растений и животных — межмикросателлитный анализ полиморфизма ДНК

(inter simple sequence repeats, ISSR). Он обладает хорошей воспроизводимостью и с успехом применяется в мировой и отечественной практике. ISSR-метод может быть использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации видов, популяций, линий, а в ряде случаев — для индивидуального генотипирования. Установлено, что ISSR маркеры имеют выраженные пороодно- и видоспецифические особенности. В связи с этим, перспективно проанализировать использование полилокусного маркирования для молекулярно-генетической идентификации популяций и стад стерляди. Ввиду необходимости охраны промысловых и исчезающих рыб особенно важны исследования популяций, претерпевающих антропогенные нагрузки [Комарова и др., с. 30].

Методы исследований ДНК делят на две группы – анализ ядерных генетических маркеров и анализ митохондриальной ДНК. Превосходство использования ядерного материала в том, что они позволяют выявить особи гибридного происхождения. Преимущество же митохондриальной ДНК для анализа видового состава имеет больше копий по сравнению с ядерной. Благодаря кольцевой структуре имеет хорошую устойчивость к деградации и лучшей сохранности [Мюге и др., с. 919].

Наиболее информативными для дискриминации видов являются метод секвенирования мтДНК и разработанные на его основе дупраймерная ПЦР и RFLP.

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

межвидовую гибридизацию в условиях аквакультуры, а также определять уровень плоидности [Тимошкина и др., с. 14].

Для контроля видовой идентификации необходимо рассматривать район происхождения рыб, с целью выявления видоспецифичных последовательностей природного полиморфизма и анализа последовательностей большого числа особей с различных участков ареала. Иначе существует опасность, что праймеры, разработанные по последовательностям рыб из одной популяции дадут ошибочный результат при анализе особи из другой популяции [Мюге и др., с. 917].

Показано, что сибирский осетр представлен генетически хорошо различающимися группировками, соответствующими гидрографическим бассейнам. При получении и выпуске молоди сибирского осетра для искусственного воспроизводства необходимо учитывать популяционную принадлежность производителей [Боровикова, с. 50]. Основным показателем в генетическом паспорте являются микросателлитные маркеры, определяющие индивидуальность каждой особи, что важно для подбора пар производителей при скрещивании для получения эффекта гетерозиса, повышения выживаемости личинок и мальков осетровых рыб и, соответственно, повышения качества товарного выращивания [Козлова и др., с. 115].

Актуальность молекулярно-генетических исследований и идентификации сибирских осетров predeterminedена широким варьированием их фенотипа под воздействием факторов внешней среды.

Для видовой идентификации двух митохондриальных митотипов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали три видоспецифичных праймера. Для микросателлитного анализа фрагментов ядерной ДНК использовали четыре локуса с флюоресцентными метками. Рассматриваемые в статье методы молекулярно-генетической идентификации осетровых используются генетиками для видовой идентификации не только особей, но и икры и других продуктов их переработки [Базелюк и др., с. 85].

Метод RAPD-PCR анализа хорошо показал себя в исследованиях популяций массовых и редких видов. Основное преимущество метода заключается, в том, что можно анализировать множество независимых локусов и не требуется предварительной информации о нуклеотидных последовательностях ДНК [Челомина, Рожкован, с. 66]. Особенности RAPD-спектров гибридов: 1) сохранение в одном геноме маркерных фрагментов ДНК обоих родителей; 2) наличие специфичных фрагментов ДНК, отсутствующих у родителей; и 3) зависимость частоты встречаемости некоторых фрагментов ДНК от направления скрещиваний. Многомерное шкалирование отчетливо разделяет в пространстве трех координат особей исходных видов и гибридное потомство с дифференциацией на группы прямых и обратных гибридов. При анализе родственных связей было установлена дифференциация видов между собой и с гибридным потомством, а также близкие генетические связи между гибридами прямого и обратного скрещиваний. Мультилокусные RAPD-маркеры в совокупности с статистическими методами являются достоверными для выявления межвидовых гибридов осетровых рыб [Рожкован и др., с. 1453].

1.5. ТИПЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ГЕНЕТИКИ РЫБ

Использование ДНК-маркеров – одно из перспективных направлений исследования генома, позволяет понять и решить практические задачи, направления исследований применяются при изучении генофонда различных видов и использования специфики их генотипа в селекционно-племенной работе. [Мариуца, с. 48].

Организация генома осетровых рыб, характеризуется рядом особенностей, а в частности низкой скоростью молекулярной эволюции. Генетические исследования показывают, что кариотипическая эволюция осетровых рыб сопровождалась ограниченным числом изменений в хромосомах.

Для изучения генетических особенностей осетровых используются различные методики. Исследования по полиморфизму изоферментных маркеров методом элетрофореза белков крови используется у осетровых для изучения генетической изменчивости domestцированных и природных стад. Идентификация межвидовых гибридов и товарной продукции базируется на исследовании нуклеотидных последовательностей.

RFLP-анализ. Первоначально рестриктазами обрабатывали тотальную клеточную ДНК, что требовало значительной сохранности биоматериала. Поэтому стали использовать тотальную митохондриальную ДНК, ее удобство связано с ее передачей только по материнской линии, по этой причине накопление мутации в молекуле происходит последовательно, причем быстрее чем в ядерной. Межвидовую и внутривидовую изменчивость исследуют, анализируя контрольный регион митохондриальной ДНК (мтДНК) с помощью набора видоспецифических праймеров.

Индивидуальные генетические особенности выявляют с помощью микросателлитного анализа фрагментов ядерной ДНК [Zane, Patarnello, с. 586; Базелюк и др., с. 82; Тимошкина и др., с. 15; Жигилева, с. 382]. Микросателлиты – локусы повторяющегося один, три, тетрануклеотидных последовательностей генома. Большое число микросателлитных последовательностей с их большой вариабельностью позволяет использовать их для выявления генетических различий не только между отдельными популяциями, но и группами особей внутри популяции. Помимо этого, микросателлиты широко применяются для исследования внутри- и межпопуляционных демографических процессов: миграции особей, дрейфа генов, резких изменений численности популяции.

AFLP-маркеры. Позволяют выявить скрытую генетическую изменчивость в близкородственных видах, оценить полиморфизм участков ядерного генома, даже при использовании анонимных проб [Боровикова, с. 48].

RAPD-фрагменты, являющиеся диплоидными доминантными маркерами (присутствующие аллели амплифицированы, отсутствующие – не амплифицированы); комигрирующие фрагменты состоят из локусов с

одинаковой нуклеотидной последовательностью, наследуемой по законам Менделя [Челомина и др., с. 62].

Исследование полиморфизма методом ISSR-PCR позволяет установить определенную специфичность спектра амплификонов в зависимости от исследуемого праймера. Праймеры для ISSR-маркеров комплементарные к микросателлитным повторам, которые имеют на конце 2-4 произвольных нуклеотида. Таким образом, можно амплифицировать фрагменты ДНК, которые находятся между двумя близко расположенными последовательностями, которые считаются уникальными.

ISSR-метод может быть использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации видов, популяций, линий, а в ряде случаев — для индивидуального генотипирования. В работах по изучению полиморфизма стерляди, была выявлена структура популяции, открыты редкие маркеры ISSR и рассмотрены два подхода в идентификации популяции стерляди – по уникальным маркерам и сочетанию полиморфных маркеров [Мариуца, с. 42, Пелеева и др., с. 21, Комарова, с. 350].

1.6.МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНЕТИКА И ФИЛОГЕОГРАФИЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Сибирский осетр делится на три подвида: первый – Обь-Иртышского бассейна, второй – от реки Лены до Чебоксар, реки Колыма и Индигирка, и третий подвид – от озера Байкал и реки Селенка до Верхней Ангары. Дальнейшее исследование показало высокую внутривидовую вариабельность. Популяция Обь-Иртышского бассейна и Байкальская популяция внесены в Красную книгу Российской Федерации. Исследования показывают, что группы рек Обь – Иртыш *A. b. baerii*, Байкал – Енисей *A. b. stenorhynchus* и Лена – Колыма *A. b. baikalensis* хорошо дифференцированы.

Ряд исследований выявил, что сибирский осетр образует близкородственный кластер с видами персидский, адриатический и русский осетры и имеет каспийское происхождение, после чего мигрировал в начале миоцена в арктический бассейн и сформировался как отдельный вид, четко отличающийся от русского осетра по эколого-биологической характеристике, а также морфологически. Гаплотипы отличаются от общей массы одной или несколькими мутациями, оставшиеся со времени заселения рек восточной популяции и участвующие в формировании новой, а редкие гаплотипы – это результат накопления мутации после того, как популяция была основана.

Исследования указывают на то что, байкальская популяция несет полный набор основных гаплотипов предковой популяции, следовательно с большей вероятностью является наиболее старой из всех пяти популяций. Предположительно, в период оледенения Байкал был благоприятным местом, в котором сибирский осетр переживал неблагоприятный период оледенения, после которого распространился во все сибирские реки через крупные озера. Популяция реки Колыма наиболее схожа по гаплотипу не с Ленским подвидом, как предполагалось из-за географической близости, а с байкальским подвидом [Барминцева, с. 352].

Стерлядь, обитающая в восточной части ареала, впадающих в Ледовитый океан рек (Обь и Енисей) генетически дифференцирована от популяций западного ареала (Дунай, Днестр и Волга), которые изучены лучше. Но существенных различий индексов молекулярного разнообразия стерляди из Обь-Иртышского бассейна не обнаружено, что указывает на единый состав популяции [Population genetic structure..., p. 146].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования были выбраны осетр сибирский и стерлядь, так как распространены непосредственно в Тюменской области.

Надкласс: *Osteichthyes* (Костные рыбы)

Класс: *Actinopterygii* (Лучеперые рыбы)

Подкласс: *Ganoidei* (Хрящевые ганоиды, хрящекостные рыбы)

Отряд: *Acipenseriformes* (Осетрообразные)

Семейство: *Acipenseridae* (Осетровые)

Подсемейство: *Acipenserinae*

Род: *Acipenser* (Осетры)

Вид: *Acipenser baerii* (Осетр сибирский)

Вид: *Acipenser ruthenus* (Стерлядь)

Подвид: *Acipenser ruthenus marsiglii* (Сибирская стерлядь)

Естественными условиями обитания осетровых рыб на территории Российской Федерации являются Волго-Каспийский, Азово-Черноморский, Дальневосточный водный бассейн, а также крупные реки и озера Сибири. В нашем случае место обитания наших объектов – это р. Иртыш близ города Тобольска, где был взят материал (приложение 4) [Рыжих и др., с. 27].

Материалом для исследования послужили рыбы, отловленные в нижнем течении реки Иртыш в пределах Тобольского и Уватского районов Тюменской области (приложение 3). В качестве орудий лова использовали ставные и плавные разноячейные сети с ячейей 24–38 мм из 5-ти метровых отрезков, с шагом ячейи 2 мм, длина ставной сети – 40 м, длина плавной сети – 60 м, высота – 2 м. Всего изучено 13 экземпляров стерляди *Acipenser ruthenus* (Linnaeus, 1758), в том числе 4 – предположительно гибридов с визуальными отличительными признаками от типичной стерляди (приложение 5). Для сравнения использовали 11 экземпляров сибирского осетра *Acipenser baerii* (Brandt, 1869), выловленных в том

же районе и предоставленных для судебной ихтиологической экспертизы органами МВД Тюменской области.

Выражаем благодарность за предоставление материала по осетровым рыбам сотрудникам Тобольской комплексной научной станции СО РАН к.б.н., с.н.с. Либерман Елизавете Львовне, к.б.н., с.н.с. Чемагину Андрею Александровичу и м.н.с. Волосникову Глебу Игоревичу.

2.2. ФИЗИКО-ГЕОГРАФИЧЕСАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Иртыш – трансграничная река, протекающая по территории Китая, Казахстана и России, относится к группе крупнейших рек земного шара [Земцова и др. 180]. Река Иртыш левый приток реки Оби. Территория входит в пределах западно-сибирской низменности и входит в равнинную зону степей и полупустынь с отметками над уровнем моря 110 до 120 м. Общая протяженность Иртыша 4422км он начинается с западного склона монгольского Алтая в КНР. Основные источники питания реки в верховьях: ледниковые и снеговые воды с гор, в средней части на равнине за счет снегов и осадков. Окружающее пространство Ишимского, Иртышского и Обь-Иртышского междуречий представляет собой ряд замкнутых бессточных озёрных бассейнов, которые не дают поверхностного стока в реку Иртыш [Добровская, Герасимов, с. 83].

Видами, составляющими ихтиофауну, главным образом, являются сиговые, осетровые, карповые, окуневые. В нижнем течении имеются зимовальные ямы, играющие важную роль в сохранении наиболее ценных видов. [Чемагин, с. 111].

По последним исследованиям выявлено, что участки нижнего течения реки Иртыш содержат повышенный уровень нефтепродуктов. Также присутствует загрязнение тяжелыми металлами, такими как: марганец и медь, реже железо, ртуть, свинец и фенолы [Земцова и др., с. 179].

2.3. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для изоферментного анализа использовали образцы мышечной ткани осетра сибирского и стерляди, которые хранились в замороженном состоянии при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Белки экстрагировали стандартным способом с использованием трис-НСl буфера (рН 8.0). Далее в полиакриламидном геле 7,5% при помощи вертикального электрофореза при разделении белков [Мауэр, с. 152]. Электрофорез проводили в электрофоретической камере фирмы «Helicon» при силе тока 80 мА, напряжении 180 В в течение 2 часов. Проведение гистохимического выявления белков произвели с учетом рекомендаций [Корочкин и др., с. 51].

ДНК экстрагировали из сердечной мышечной ткани, фиксированной в 70 % этаноле методом щелочного лизиса [Bender et al., p.20].

Для генотипирования использовали два типа маркеров – участок контрольного региона мтДНК и последовательности, ограниченные простыми повторами – Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). Амплификацию последовательностей, ограниченных простыми повторами, проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей ПЦР буфер (0.01 М трис-НСl, 0.05 М КСl, 0.1 % тритон X-100), 4 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого из dNTPs, 1 мкл раствора тотальной ДНК, 2.5 мМ праймера и 0.2 ед/мкл Tag-полимеразы в следующем режиме: 94 $^{\circ}\text{C}$ – 7 мин, затем 94 $^{\circ}\text{C}$ – 30 с, 52(56) $^{\circ}\text{C}$ – 45 с, 72 $^{\circ}\text{C}$ – 2 мин (40 циклов), 72 $^{\circ}\text{C}$ – 7 мин. Для ISSR-PCR анализа использовали 4 праймера: P1 (UBC808) (AG)8C, P2 (UBC809) (AG)8G, P3 (UBC807) (AG)8T, P6 (UBC 25) (AC)8T.

Для изучения полиморфизма контрольного региона мтДНК использовали последовательности праймеров (Таблица 1) и условия проведения реакции, предложенные Н. С. Мюге с соавторами [Мюге и др., 2008, с. 916], с модификациями.

Праймеры для видовой идентификации видов осетровых [Мюге и др., 2008]

Название	Последовательность	Используется	Длина продукта	Видоспецифичность
AHR	TATACACCATTTATCTCTATGT	-	-	Все виды
AGF	GCACGACTATGTGGTATCCAGAA	AHR	420	Русский осетр
ABF	CAGATGCCAGTAACAGGCTGA	AHR	215	Русский и сибирский осетры
ABRM	TGTCTGTCTAGAACATAcG		182	Сибирский осетр
HusF	TATCTATTACCTGCGAGCAGGCTG	AHR	374	Белуга
DauF	CCTCTTATGTACGCGGTG	AHR	439	Калуга
NudF	TGTCTTTTCTGGAAGGAGCTTTGC	AHR	329	Шип
RutF	GGGAATAACCGTTAATTTGG	AHR	190	Стерлядь
SteF	GGGGTTCTTGGCATGTTGTGAGCG	AHR	266	Севрюга
SchF	TGTGGGGTCACGGAcTTTACAG	AHR	254	Амурский осетр

Модификации протокола ПЦР контрольного региона митохондриальной ДНК для видовой идентификации осетровых рыб: H₂O 14.5 мкл; X1 ПЦР буфер 2.5 мкл; 2.5 mM MgCl₂ (сток 25 mM) 2.5 мкл; 2.5 mM каждого из dNTPs (сток 10 mM) 6.25 мкл; 10 пМ праймера (сток 10 мкМ праймер) 1 мкл; 2.5 ед *Taq*-полимеразы (сток 5 ед/мкл) 0.25 мкл; раствор тотальной ДНК 2 мкл; TOTAL 25 мкл.

ПЦР контрольного региона проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация 95 °С – 2 мин, затем 35 циклов, состоящих из четырех стадий: 15 с – 94 °С, 20 с – 56 °С, 30 с – 72 °С, 2 мин. – 72 °С. Терминальная элонгация 72 °С 10 мин. [Мюге и др., 2008 с. 916].

Анализ ПЦР-фрагментов осуществляли в 2% агарозном геле. Длины фрагментов определяли с помощью маркера молекулярных масс ДНК 100bp («Fermentas»). Гели документировали с помощью системы VersaDoc (Bio-Rad). При идентификации продуктов реакции использовали схему (Рисунок 1) [Мюге и др., 2008, с. 916].

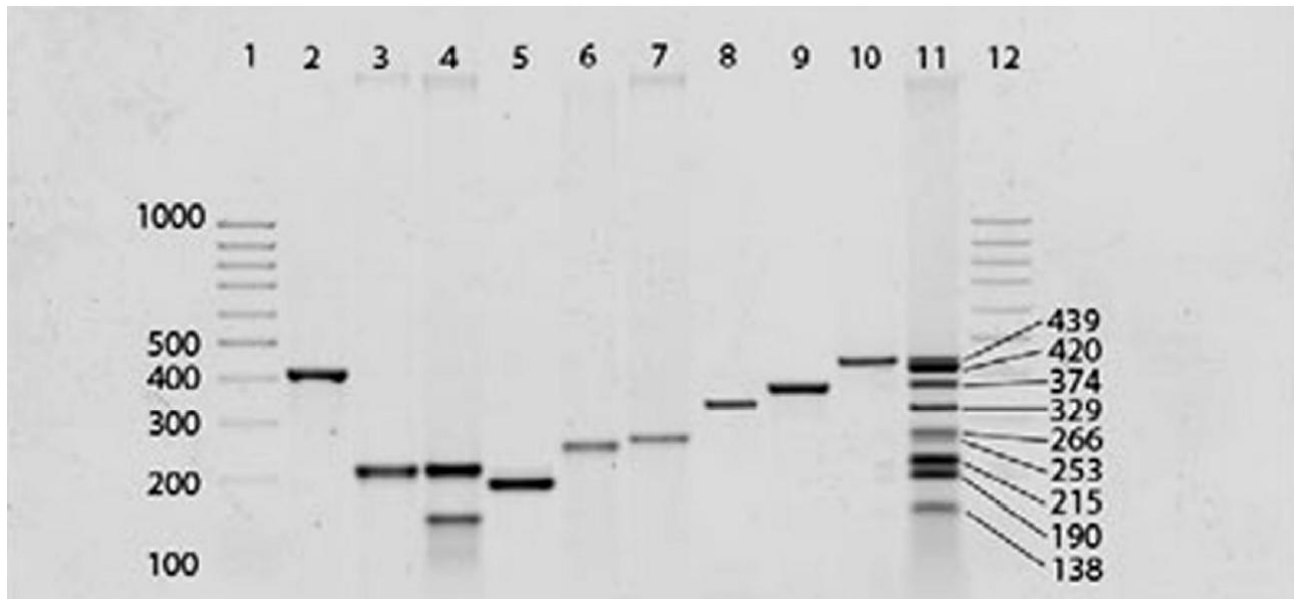


Рис. 1. Визуализация ПЦР-продуктов для разных видов осетров в агарозном геле. (Мюге и др., 2008). На дорожках 1-12 – маркеры молекулярной массы ДНК; 2,3 – *A. gueldenstaedtii*; 4 – *A. baerii*; 5 – *A. ruthenus*; 6 – *A. schrenckii*; 8 – *A. nudiventris*; 9 – *H. huso*; 10 – *H. dauricus*; 11 – маркер масс ПЦР-продуктов осетровых [Мюге и др., 2008, с. 916].

Расчет стандартных популяционно-генетических характеристик произведен при помощи программы POPGEN32 [Yeh et al., p.27; Жигилева, с. 358].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГИБРИДОВ СРЕЛЯДИ И СИБИРСКОГО ОСЕТРА ПО МАРКЕРАМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Полиморфизм мтДНК чаще используют для видовой дифференциации. Достаточно хорошо для этих целей изучены последовательности D-петли и гена цитохрома b [Doukakis, Birstein et al., p. 460; Walsh et al., p. 45; Корниенко и др., с. 73]. Несмотря на то, что молекула мтДНК содержит различные гены, с позиции классической генетики она рассматривается как один локус, а гаплотипы мтДНК — как аллели этого локуса [Алтухов, с. 1180].

[изъята 1 страница]

3.2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТЕРЛЯДИ И СИБИРСКОГО ОСЕТРА РЕКИ ИРТЫШ ПО ISSR-МАРКЕРАМ

[изъято 4,5 страницы]

3.3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТЕРЛЯДИ И СИБИРСКОГО ОСЕТРА РЕКИ ИРТЫШ ПО ИЗОФЕРМЕНТАМ

[изъято 3 страницы]

ВЫВОДЫ

1. Комплексный анализ с использованием ядерных и митохондриальных маркеров подтвердил гибридную природу атипичных особей стерляди, отловленных в р. Иртыш.
2. В ходе исследования митохондриальных маркеров ДНК было выявлено, что материнскими особями данных гибридов были самки сибирского осетра.
3. Гибриды имеют более высокие показатели наблюдаемой гетерозиготности при анализе изменчивости шести ферментных систем и белков мышц.
4. Использование мультилокусных ДНК-маркеров и изоферментных локусов дает сходные результаты и указывает на большее сходство ядерной ДНК гибридов с сибирским осетром.
5. Последовательность контрольного региона митохондриальной ДНК в совокупности с ядерными ISSR- маркерами может быть использована для идентификации гибридных особей в естественных популяциях осетровых рыб.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Bender W., Spierer P., Hogness D.S. Chromosome walking and r jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the *bithorax* complex of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 1983. P. 17-33.
2. Doukakis P., Birstein V. J., De Salle R. Intraspecific structure within three caviar-producing sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*, *A. stellatus* and *Huso huso*) based on mitochondrial DNA analysis // *J.Appl. Ichth.* Vol.21. 2005. P.457–460.
3. Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in eight sturgeon species and development of a system for DNA-based species identification / Mugue N. S., Barmintseva A. E., [et al] // *Russian Journal of Genetics.* vol. 44. no. 7. 2008. pp. 793–798.
4. Population genetic structure and phylogeography of sterlet (*Acipenser ruthenus*, *Acipenseridae*) in the Ob and Yenisei river basins / Pobedintsevsa M.A. Makunin A.I, Kichigin I.G. [et al] // *Taylor & Francis*, №6. 2018. pp.156–164.
5. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). Zane L., Patarnello T., Ludwig A. [et al]. *Mol. Ecol. Notes.* vol. 2. 2002. pp. 586–588.
6. Walsh M. G., Bain M. B., Squiers T., Waldman J. R., Wirgin I. Morphological and genetic variation among Shortnose Sturgeon *Acipenser brevirostrum* from Adjacent and Distant Rivers // *Estuaries.* Vol.24. 2001. P.41–48.
7. Yeh F.C., Yang R., Boyle T. POPGENE. Version 1.31. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. 1999. P. 27.
8. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome Finger printing by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics.* V. 20. № 2. 1994. P. 176–183.
9. Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // *Генетика.* Т.38. №9. 2002. С.1173–1195.

10. М Багиров В.А., Эрнест Л.К., Насибов Ш.Н. и др. Сохранение биоразнообразия животного мира и использование отдаленной гибридизации в животноводстве. Достижения науки АПК, 2009. С. 55–56.
11. Базелюк Н.Н., Мухамедова Р.М., Козлова Н.В., Файзулина Д. Р. Коллекция эталонных генетических материалов Осетровых (*ACIPENSERIDAE*) волжско-каспийского бассейна // Актуальные вопросы ветеринарной биологии № 1 (21). 2014. С. 23–26.
12. Базелюк Н.Н., Козлова Н.В., Мухамедова Р.М. Молекулярно-генетическая идентификация русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) из естественных популяций волжско-каспийского бассейна // А: Естественные науки. № 2 (43). 2013. С. 82–86.
13. Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Природный генетический полиморфизм и филогеография сибирского осетра *Acipenser baerii* Brandt, 1869 // Генетика Т. 53(3). 2017. С. 345–355.
14. Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Генетический полиморфизм сибирского осетра *Acipenser baerii* Brandt, 1869 в аквакультуре // Генетика Т. 54. № 2. 2018. С. 216–223.
15. Баранов А.А. Рыбоводно-биологическая характеристика гибридов сибирского осетра со стерлядью. Дисс. Канд. биол. наук: специальность 03.00.10. Москва, 2000. 126 с.
16. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. Санкт-Петербург: Акад. наук СССР, 1949. 232 с.
17. Боровикова Е.А. Молекулярно-генетические исследования в решении проблем филогении и филогеографии сиговых рыб. Труды ИБВВ РАН, вып. 73(76). 2016. С. 46 – 63.
18. Бурцев И.А. Биологические основы полноциклового культивирования осетровых рыб и создание новых парод методами гибридизации и селекции. Автореферат. Москва. 2013. 46 с.
19. Бучацкий Л.П. Биотехнология аквакультуры рыб // Институт рыбного хозяйства УААН № 6. 2013. С 45–57.

20. Власов В.А., Маслова Н.И., Павлов А.Д. Сохранение и восстановление генофонда рыб аквакультуры России // Известия ТСХА № 5. 2012. С. 83–92.
21. Волосников Г.И., Алдохин А.С. Характеристика трудноидентифицируемых представителей рода *Acipenser* р. Иртыш // Вестник АГТУ №2. 2018. С. 90 – 98.
22. Волосников Г.И. Обзор данных по биологии стерляди // Вестник АГТУ. № 2 (64), 2017. С. 67–72.
23. Гадинов А.Н. Искусственное воспроизводство осетровых рыб в целях сохранения ихтиофауны р. Енисей // Вестник КрасГАУ №4, 2008.С. 140 – 153.
24. Гершанович А.Д., Пегасов В.А., Шатуновский М.И. Экология и физиология молоди осетровых // Москва: Агропромиздат, 1987. 214 с.
25. Дубровская Л.И., Герасимова В.Р. Анализ колебаний стока рек Обь–Иртышского междуречья // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, т. 17, №6. 2015. С 82 – 86.
26. Глазко В. И. Введение ДНК технологии и биоинформатику // К.: 2001. 544 с.
27. Жигилева О.Н. Генетическое разнообразие популяции серебряного карася в зависимости от типа размножения и размера водоема // Поволжский экологический журнал №4. 2016. С. 381 – 389.
28. Залоило О.В., Борисенко Н.А. Исследование специфики генетической структуры популяции белого и пестрого толстолобиков по микросателлитным маркерам // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства №1. 2015. С.143–150.
29. Земцова Е.С., Алимова Г.С., Токарева А.Ю. Химико – экологическая оценка состояния донных отложений реки Иртыш на территории Тюменской области РФ // Вестник Мурманского государственного технического университета. № 1. 2019. С. 177 - 187.
30. Казарникова А.В., Ловчикова Я.Б., Шестаковская Е.В., Чмырь Ю.Н. К вопросу о влиянии факторов внешней среды на осетровых рыб, выращиваемых в аквакультуре // Естественные науки №3. 2011. С. 50–55.

31. Кокоза А.А. О стандарте и некоторых других вопросах в осетроводстве // Вестник АГТУ №1. 2010. С. 103-106.
32. Козлов В.Н., Абрамович Л.С. Справочник рыбовода М.:Россельхозпромиздат, 1980. 220 с.
33. Козлова Н.В., Базелюк Н.Н., Файзулина Д.Р., Стоногшина Е.В. Молекулярно- генетических исследований в аквакультуре осетровых рыб // Вестник АГТУ. Спр: Рыбное хозяйство №3. 2013. С. 113 – 117.
34. Комарова Л.В., Костицина Н.В., Боронникова С.В., Мельникова А.Г. Генетическая структура естественных популяций стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) в бассейнах рек Кама и Обь на основании полиморфизма ISSR маркеров // Сельскохозяйственная биология т.53(2). 2018. С. 348–354.
35. Корочкин Л.И., Серов О.А., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977. 278 с.
36. Корниенко И. В., Войнова Н. В., Чистяков В. А. и др. Полиморфизм первичной последовательности сегмента гена цитохрома и митохондриальной ДНК азовской популяции *Acipenser gueldenstaedtii* // Вопр. ихтиологии. Т.43. 2003. С.73–77.
37. Кривошеин В.В. Основные виды осетровых используемых в тепловодной биотехнологии в условиях верхней Волги // Вестник костромского государственного университета №7. 2006. С. 10 – 20.
38. Кривошеин В.В. Гибридизация Ленского осетра и стерляди в условиях тепловой аквакультуры // Вестник КГУ № 10. 2006. С. 14–16.
39. Кузьмин Е.А. Способ биохимического контроля за структурой популяции рыб // Патентное ведомство: СССР. 1988. С.3.
40. Кузьмин Е.В., Кузьмина О.Ю. Полиморфизм локуса миогенов у некоторых представителей семейства осетровых (*Acipenseridae*) // Генетика т.50 №9. 2014. С. 1089–1097.
41. Курбатский А.А., Заделенов В.А., Мучкина Е.Я. К современной характеристике размерно – весовой и половой структуры популяции

- сибирского осетра в бассейне Енисея // Вестник КрасГАУ №12. 2009. С. 119–123.
42. Лагутов В.В. Решение задачи сохранения биоресурса осетровых // Известия оренбургского государственного университета №2(10). 2006. С.129–131.
43. Либерман Е. Л. Анализ линейно-весовых показателей и меристических признаков сибирской стерляди *Acipenser ruthenus marsiglii* (Brandt, 1833) бассейна реки Иртыш // Вестник АГТУ. 2 № 2 (64). 2017. С. 83–89.
44. Мариуца А.Э. Анализ генетической структуры чешуйчатого карпа при использовании ДНК маркеров (ISSR-PCR) // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. 2016. С. 45–53.
45. Маурер Г.В. Дискэлектрофорез. Теория и практика электрофореза в ПААГ. М.: Мир. 1971. 243 с.
46. Михайлов М. М. Женихова Н.И. Сравнительная морфология разных видов осетров. // Молодежь и наука №12. 2016. С. 13.
47. Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Расторгуев С.М., Мюге В.Н., Барминцев В.А. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика, т. 44 , №7. 2008. С. 913–919.
48. Мюге Н.С., Яхонтова А.Е., Барминцева А.Е., Бурлаченко И.В., Николаев А.И., Моисеев А.Р. Осетры: удивительные рыбы на грани уничтожения или источник деликатесных продуктов? Что нужно знать, приобретая черную икру и осетрину. М.: Всемирный фонд дикой природы (WWF), 2014. 56 с.
49. Никоноров С.И. Ветвицкая Л.В. Эколого-генетические проблемы искусственного воспроизводства осетровых и лососевых рыб. // М.: Наука. 1993. 253с.
50. Новосадов А.Г. Морфологическая и продукционная характеристика гибрида сибирского осетра и белуги. Автореферат. Москва. 2011. 24 с.
51. Павлов Д.С., Сбикин Ю.Н. Морфология, экология и поведение осетровых. М. : Наука. 1989. 199 с.

52. Павлов А.Д., Сафронов А.С., Ефимов А.Б., Ежкин М.А. К вопросу об отдаленном естественном гиногенезе и гибридогенезе у гидробионтов // Вестник астраханского государственного технического университета. Серия: рыбное хозяйство. №4. 2016. С.108 – 115.
53. Паренский В.А., Скирин В.И., Романов Н.С. Анализ стабильности морфологического облика и наследуемости признаков при гибридизации осетровых рыб // Известия ТИНРО т.155. 2008. С.230–248.
54. Пелеева А.Р., Комарова Л.В., Васильева Ю.С. Анализ генетического разнообразия естественных популяций и ремонтно – маточных стад стерляди на основании полиморфизма межмикросателлитных маркеров // Бюллетень науки и практики т.4 №4. 2018. С. 20 – 29.
55. Пономарев С.В. Осетроводство на интенсивной основе. Санкт-Петербург: Лань. 2013. 350 с.
56. Пономарев С.В., Болонина Н.В., Чалов В.В., Сариев Б.Т., Туменов А.Н. Рост осетровых рыб при использовании технологии интенсивного выращивания // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. №1. 2010 С. 77–85.
57. Привезенцев Ю.А., Анисимова Е.А., Тарасов Е.А. Прудовое рыбоводство. М.: Колос, 1980. 199 с.
58. Решетняк О.С. Экстремально высокий уровень загрязнения воды по длине рек Обь и Иртыш // Наука и современность №21. 2013. С. 24 – 27.
59. Рожкован К.В. Молекулярная эволюция 18S рДНК и генетическое разнообразие осетров Амура *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 и *Huso dauricus* (Georgii, 1775) Автореферат. Владивосток. 2008. 21с.
60. Рожкован К.В., Челомина Г.Н., Рачек Е.И. Молекулярная идентификация и особенности генетического разнообразия межвидовых гибридов амурского осетра (*Acipenser schrenckii* X *A. baerii*, *A. baerii* X X *A. schrenckii*, *A. schrenckii* X *A. ruthenus* И *A. ruthenus* X *A. schrenckii*) по данным изменчивости мультилокусных RAPD-маркеров // Генетика, т. 44, № 11. 2008. С.1453–1460.

61. Романов Н.С., Скирин В.И. Морфологическая изменчивость некоторых осетровых рыб и их искусственных гибридов // Аквакультура. т.165. 2011. С. 283–296.
62. Рубан Г.И. Сибирский осетр *Acipenser baerii* Brandt : (Структура вида и экология) : [Монография]. М. : ГЕОС, 1999. 235 с.
63. Рубан Г.И., Ходоревская Р.П., Кошелев В.Н. О состоянии осетровых в России // Астраханский вестник экологического образования № 1 (31). 2015. С. 42–50.
64. Рыжих С.М., Беспалова Н.С. Эколога – биологическая характеристика осетровых рыб (*ACIPENSERIDAE*) // Научное обозрение. № 2. 2019. С. 27 – 29.
65. Столповский Ю. А., Лазебный О.Е., Столповский К.Ю., Сулимова Г.Е. Применение межмикросателлитного анализа ДНК для оценки популяционной структуры, идентификации и сходства генофондов пород и видов доместцированных животных // Генетика т. 46 –№ 6. 2010. С. 825–833.
66. Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Усатов А.В. Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (*Acipenseriformes*) // Экологическая генетика том VIII № 1. 2010. С. 12–24.
67. Топчиева Л.В., Федоренко О.М. Методические подходы для изучения молекулярных механизмов адаптации популяции // Труды Карельского научного центра РАН № 5. 2014. С. 30–43.
68. Третьякова Т.В. Сезонное распределение сибирской стерляди на Тобольско-Уватском участке реки Иртыш // Естественные и математические науки в современном мире № 11(23). 2014. С. 140–144.
69. Харзанова В.Р., Денискова Т.Е., Сермягин А.А. и др. Эволюция методов оценки биоразнообразия северного оленя // Сельскохозяйственная биология т. 52. №6. 2017. С. 1083-1093.

70. Ходоревская Р.П. Значение естественного нереста и искусственного осетроводства в формировании запасов осетровых Каспийского моря // Астраханский вестник экологического образования, № 2 (32). 2015. С 74–89.
71. Ходоревская Р.П., Калмыков В.А., Жилкин А.А. Современное состояние запасов осетровых каспийского бассейна и меры по их сохранению // Вестник АГТУ серия: рыбное хозяйство. №1. 2012. С. 99–106.
72. Челомина Г. Н., Рожкован К. В., Иванов С. А. Дискриминация межвидовых гибридов в природных популяциях осетровых рыб Амура с помощью мультилокусных RAPD-PCR маркеров // Цитология и генетика. т.42 № 5. 2008. С. 61–72.
73. Чемагин А.А. Рыбное население и его биотопическое распределение в бассейне нижнего Иртыша // Современные проблемы науки и образования №2. 2015. С.500.
74. Шедько С.В., Мирошниченко И.Л., Немкова Г.А. и др. Изменчивость митохондриальной ДНК, историческая демография и популяционная структура амурского осетра *рыб (Acipenseriformes)* Brandt, 1869 // Генетика: т. 51. № 2. 2015. С. 200–216.

Сибирский осетр (*Acipenser baerii* Brandt, 1869)



Стерлядь (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758)



Место отлова рыб



Ареалы обитания сибирского осетра и стерляди и места их пересечения



*Примечание: цифрами 2 и 4 обозначены исследуемые в данной работе виды.

Количество гибридов от общей выборки

