

На правах рукописи

Сергеев

**Сергеев
Алексей Алексеевич**

**Популяционно-генетическая структура
и филогенетические связи русского осетра
Acipenser gueldenstaedtii Brandt, 1833**

03.02.06 – ихтиология

03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020 г.

Работа выполнена в отделе молекулярной генетики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и
океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО»), г. Москва

Научные руководители: **Глубоковский Михаил Константинович**
доктор биологических наук,
научный руководитель ФГБНУ «ВНИРО»
Мюге Николай Сергеевич
кандидат биологических наук,
начальник отдела молекулярной генетики
ФГБНУ «ВНИРО»

Официальные
оппоненты: **Панов Валерий Петрович**
доктор биологических наук, профессор кафедры
морфологии и ветеринарно-санитарной экспертизы
ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный
университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»,
г. Москва

Политов Дмитрий Владиславович
доктор биологических наук, заведующий
лабораторией популяционной генетики ФГБУН
«Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук», г. Москва

Ведущая организация: ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им.
И.Д. Папанина Российской академии наук», п. Борок

Защита состоится «19» марта 2020 г. в 13³⁰ на заседании диссертационного
совета Д 307.004.04 при Федеральном государственном бюджетном научном
учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного
хозяйства и океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО») по адресу: 107140, г. Москва, ул.
Верхняя Красносельская, д. 17, телефон: +7 (499) 264-69-83,
e-mail: sedova@vniro.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «ВНИРО»
по адресу: http://vniro.ru/files/disser/2019/sergeev_disser.pdf

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного
совета, к.б.н.



Седова Марина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

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

Изучение особенностей генофонда русского осетра может дать новые сведения о популяционной структуре и филогенетических связях вида, а также помочь в решении практических задач по идентификации особей русского, персидского и сибирского осетров, а также продукции из них. Поиск новых информативных генетических маркеров по-прежнему актуален, так как известные в настоящее время генетические маркеры позволяют решать данные задачи лишь частично (Birstein et al., 2005; Krieger et al., 2008; Мюге и др., 2008; Барминцева, Мюге, 2013).

Цели и задачи исследования. Цель настоящей работы – уточнение популяционной структуры русского осетра и его филогенетических связей с близкими осетровыми видами, а также оценка полиморфизма маточных стад русского осетра волжских ОРЗ (осетровых рыбоводных заводов) и вклада искусственного воспроизводства в поддержание численности его волжско-каспийской популяции.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить природный генетический полиморфизм русского осетра и производителей в современных маточных стадах волжских ОРЗ, участвующих в воспроизводстве молоди для поддержания природной численности волжско-каспийской популяции русского осетра.
2. С помощью анализа митохондриальных и ядерных маркеров ДНК оценить генетическую дифференциацию между русским, персидским и сибирским осетрами.
3. Провести филогенетическую реконструкцию формирования комплекса популяций русского, а также персидского осетров.
4. Сравнить морфометрические показатели персидских и русских осетров из Каспийского моря и оценить уровень морфологической дифференциации выборок между собой.
5. Оценить генетическую дифференциацию между выборками русского осетра из Азовского, Черного и Каспийского морей.
6. Оценить вклад искусственного воспроизводства в численность волжско-каспийской популяции русского осетра.

Положение, выносимое на защиту:

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

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

Также впервые было проведено комплексное исследование различных выборок русского, персидского и сибирского осетров с использованием генетических маркеров как митохондриальной, так и ядерной ДНК (AFLP- и SNP-анализ). Впервые данные генетические методы были использованы для оценки генетических расстояний между выборками русского и персидского осетров совместно с проведением морфометрического исследования.

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

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные позволяют уточнить популяционную структуру и филогенетические связи русского осетра с персидским и с сибирским осетром. Найденные новые информативные генетические маркеры могут быть использованы при разработке панели для идентификации видовой и популяционной принадлежности особей осетровых рыб и продукции из них для решения задач в рамках выполнения международной конвенции СИТЕС.

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

Личное участие автора. В работе для генетического анализа использовали как ранее собранные образцы тканей осетровых рыб, внесенные в Российскую национальную коллекцию эталонных генетических материалов (РНКЭГМ) ВНИРО, так и образцы, собранные автором в экспедициях и во время бонитировок на ОРЗ. Планирование, пробоподготовка, молекулярно-генетический анализ популяционных выборок осетровых, статистическая обработка, систематизация и анализ полученных результатов выполнялись автором лично. Результаты генотипирования молоди, полученные автором, сопоставлялись с базой данных осетровых производителей волжских ОРЗ, в создании которой автор также принимал участие.

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

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

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе 1. «Обзор литературы» проводится сравнительный анализ работ по исследованию популяционной и нерестовой структуры русского осетра, описывается история вопроса выделения персидского осетра как самостоятельного вида, рассматриваются особенности кариологии и генетики осетровых рыб, приводятся работы по филогенетическим и популяционно-генетическим исследованиям, связанным с группой русский – персидский – сибирский осетр.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Материалы. Образцы тканей для молекулярно-генетических исследований собирали в период с 2002 по 2016 гг. в экспедициях, а также во время бонитировок и при получении икры на рыбоводных осетровых заводах. В рамках данной работы различными молекулярно-генетическими методами в общей сложности было исследовано 1163 особи.

Для анализа частот BL («baerii-like») и типичного для русского осетра GUE митотипов были проанализированы выборки русского осетра азовской, черноморской и волжско-каспийской популяций, морские сборы персидского осетра из Северного и Южного Каспия, а также выборки яровой и озимой нерестовых рас русского осетра из р. Волга и р. Урал. Минимальный размер каждой выборки составлял 48 образцов.

Для AFLP-анализа отобрали по 8 образцов для каждой выборки: русские осетры из северной части Каспийского моря, русские осетры из Азовского моря, персидские осетры из южной части Каспийского моря, сибирские осетры из р. Обь.

Для морфометрического исследования русского и персидского морфотипов была взята смешанная выборка особей, выловленных в северной части Каспийского моря в 2008 г., которая затем была разделена на 82 особи типичного русского морфотипа и 72 особи персидского морфотипа.

Полученные тестовые выборки затем были использованы для проведения исследования на наличие VL-митотипа и для оценки полиморфизма ядерных генов по локусам однонуклеотидного полиморфизма.

Для исследований молоди в речном рейсе 2016 г. траловые работы велись на участке главного судоходного канала р. Волги в трех локациях (Рисунок 1, слева).

В качестве орудия лова использовался 4,5-метровый донный трал для ловли молоди с 1,5-метровой вставкой из газового сита № 8.

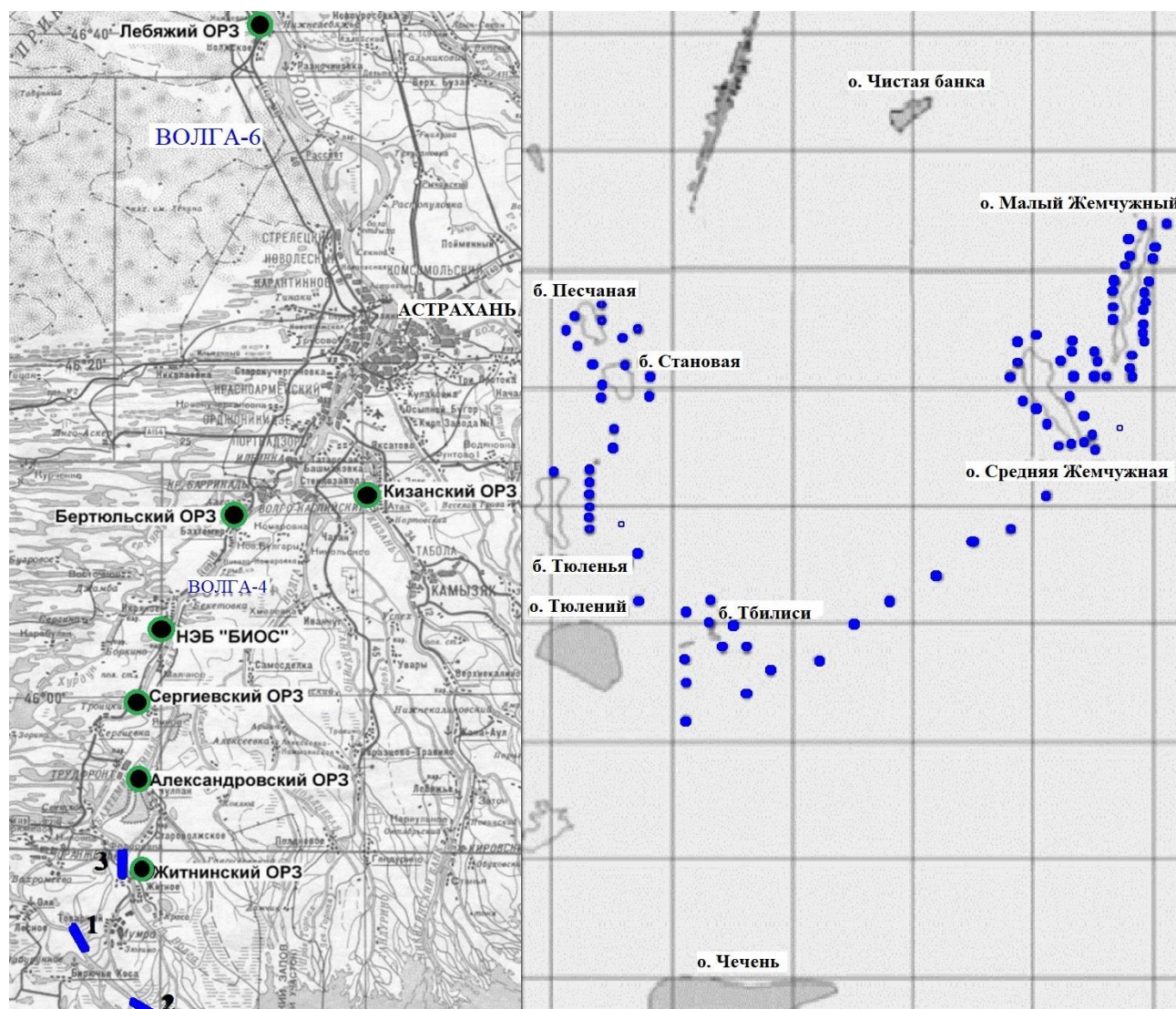


Рисунок 1 – Слева: карта проведения контрольных выловов молоди в рейсах на р. Волге (ОРЗ отмечены зелеными кругами, участки траления отмечены синими прямоугольниками: 1 - 4-я Огневка, 2 - 8-го Марта, 3 - Рот Фронт); справа: карта траловых станций морского рейса 2016 г., Каспийское море (траловые станции отмечены синими точками)

Общее количество выловленных и измеренных особей в речном рейсе составило 1047 из них 1043 особи русского осетра. За десять дней рейса во всех локациях для проведения генетических исследований были взяты образцы тканей суммарно от 266 сеголетков осетровых. С 27 августа по 15 сентября 2016 г. в рамках морского каспийского рейса для дальнейшего изучения были взяты фрагменты плавников от 197 особей сеголетков русского осетра. Точки траловых станций представлены на Рисунке 1, справа.

Морфометрическое исследование. У каждой особи из смешанной выборки осетров русского и персидского морфотипов, выловленных в Северном Каспии, были проанализированы традиционно используемые в работах по морфометрии осетровых меристические признаки – SD, SL1, SL2, SV1, SV2 и пластические признаки – L, l, C, R, aD (LD), Hco, Hc, Srci, SRr, Rr (Магерамов, 1972; Крылова и Соколов, 1981; Артюхин, 2008). Для исследования дополнительно были добавлены экспериментальные неклассические параметры Sp - ширина тела у основания брюшных плавников, Sd - ширина тела у переднего края спинного плавника, Sao – ширина рострума на уровне *anter orbitale*. У особей фиксировали тип окраски, были сделаны фотографии - вид сверху и сбоку, общий вид головы. Дополнительно в протокол описаний заносились данные по предварительной экспресс-оценке принадлежности особи (персидский или русский морфотип). В протоколе обязательно отмечалось, если особь обладала промежуточным морфотипом.

По полученным морфометрическим данным провели оценку достоверности различий индексов между выборками с персидским и русским морфотипами. Меристические признаки были проанализированы с помощью теста Манн-Уитни и критерия Стьюдента, индексы пластических признаков – с помощью дисперсионного анализа ANOVA, а для совокупности особей и всех признаков был проведен PCA анализ (в пространстве главных компонент). Для расчетов использовался пакет программ Statistica v.6.0.

Выделение ДНК. Выделение и очистку ДНК из плавников осетровых рыб проводили либо солевым методом (Aljanabi, Martinez, 1997), либо на адсорбционных колонках PALL 5051 (AcroPrep™) (Ivanova et al., 2006).

Тест на BL-митотип. Определение митотипа особей проводили по методике, разработанной во ВНИРО (Мюге и др., 2008) с использованием постановки мультплексной ПЦР с видоспецифичными праймерами AHR, AGF, ABF, ABRM с последующим разделением ПЦР-продукта в 2% агарозном геле. Достоверность полученных различий для 95% доверительного интервала по частотам BL митотипа проводилось по одному качественному признаку для выборок разного объема с применением U-критерия.

AFLP-метод. Для исследования ядерных маркеров ДНК использовали данный метод, являющийся разновидностью «фингерпринта» (Vos et al., 1995). Для реакции рестрикции использовали рестриктазы EcoRI (Fermentas, Латвия) и MspI (Sibenzyme, Россия), затем проводилось лигирование адапторов, преселективная и селективная ПЦР с использованием восьми комбинаций флуоресцентных праймеров.

Для разделения и визуализации полученных фрагментов использовали капиллярный полиакриламидный электрофорез на приборе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems).

Обработку и анализ полученных AFLP-профилей проводили с использованием программного пакета Phoretix 1D Advanced Software v. 5.20 (Nonlinear Dynamics). Полученные бинарные матрицы в дальнейшем обсчитывали в статистической программе Tools for Population Genetic Analysis v 1.3 (TFPGA). Для оценки частот доминантных маркеров был использован подход авторов Lynch & Milligan (1994), позволяющий работать с тетраплоидными видами. С помощью метода UPGMA получили матрицу генетических расстояний (Nei, 1978) между исследуемыми выборками и построили дендрограмму с расчетом бутстрэп поддержки полученной топологии.

Однонуклеотидный полиморфизм (SNP-анализ). В рамках международного проекта «SturSNIP» на тестовых выборках персидского и русского осетров с проведенным ранее морфометрическим анализом протестировали 13 отобранных по результатам полногеномного секвенирования предположительно информативных SNP-локусов. Для каждого подобрали условия ПЦР реакции и оценили примерный полиморфизм. Отдельно на выборках русского осетра из Азовского, Черного, Каспийского морей, выборках персидского осетра, а также выборках сибирского осетра из ленской и обско-иртышской популяций протестировали 14-й locus, предположительно информативный для идентификации различных видов осетровых.

В связи с тем, что функциональная плоидность данных локусов была неизвестна, далее применили метод Primer Extension с использованием 10 дополнительных ядерных информативных SNP-локусов с уже известным тетрасомным наследованием, полученных на основании совместной работы с Национальным исследовательским центром «Курчатовский институт» (Rastorguev et al., 2013). Для данных локусов также написали праймеры и подобрали условия амплификации. Для этого этапа работы использовали следующие выборки – русский осетр: Средний и Южный Каспий – 81 шт., Северный Каспий – 86 шт., р. Волга – 47 шт., черноморская популяция – 48 шт.,

азовская популяция – 48 шт; персидский осетр: Южный Каспий – 96 шт., Северный Каспий – 81 шт; сибирский осетр из р. Обь – 40 шт.

Для полученных электрофореграмм по 10 локусам рассчитали доз-эффекты и составили таблицу частот для каждой выборки. Полученные данные обработали в программах STRUCTURE 2.3.4 и GenAlex 6.5., а также с помощью пакета R-статистики MonPop.

Генетический мониторинг молоди осетровых и производителей ОРЗ. Провели секвенирование контрольного региона мтДНК (D-петли) у производителей и молоди с использованием праймеров: DL651 и M13AHR3 (Мюге и др., 2008). Для секвенирования использовался прибор ABI Prism Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводились с помощью биоинформатического пакета программ SeqMan® Lasergene 12.0. (DNASTAR. Madison, WI, США).

Для проведения микросателлитного анализа в рамках генетического мониторинга молоди и производителей осетровых применяли панель из шести высокополиморфных микросателлитных локусов с тетрасомным наследованием Afug41, Afug51 (Welsh et al., 2003), An20 (Zane et al., 2002), AoxD161, AoxD165 (Henderson-Arzapalo et al., 2002). Для разделения и визуализации полученных фрагментов использовали капиллярный полиакриламидный электрофорез на приборе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems).

Статистическая обработка. При дальнейшей обработке полученных данных в рамках генетического мониторинга для определения принадлежности к осетровому заводу ювильной особи применяли разработанную в лаборатории молекулярной генетики ВНИРО программу определения родительской пары для тетраплоидных видов рыб Tetraploid Parentage Analyze ver. 02 (TPA v.02) (операционная система MS Windows).

Глава 3. Результаты

Генетический полиморфизм ремонтно-маточных стад волжских ОРЗ

Анализ полученных данных показал высокий генетический полиморфизм маточных стад русского осетра на всех исследованных ОРЗ. Из 110 самок БОРЗ, для которых определили последовательность контрольного региона мтДНК, нами был выявлен 81 различный гаплотип (гаплотипическое разнообразие $H=0,74$). У исследованных 122 самок с ЖОРЗ выявили 84 различных мтДНК гаплотипа ($H=0,69$). В стаде производителей КОРЗ у 45

самок выявили 37 различных мтДНК гаплотипов ($H=0,84$). У 118 самок СОРЗ выявили 76 различных гаплотипов (гаплотипическое разнообразие $H=0,64$). В ЛОРЗ 63 самки несли 52 различных мтДНК гаплотипа ($H=0,82$). В стаде производителей АОРЗ у исследованных 60 самок выявили 35 различных мтДНК гаплотипов ($H=0,58$).

Значительных различий между заводами и между полами по каждому из микросателлитных локусов не выявили, что подтверждает соответствие стад производителей на всех исследованных ОРЗ по уровню генетического полиморфизма природной волжско-каспийской популяции русского осетра. Примеры сопоставления частот аллелей для трех ОРЗ по данным 2016-2017 гг. представлены на Рисунке 2 и Рисунке 3. По оси X представлены названия аллелей, по оси Y – их частоты.

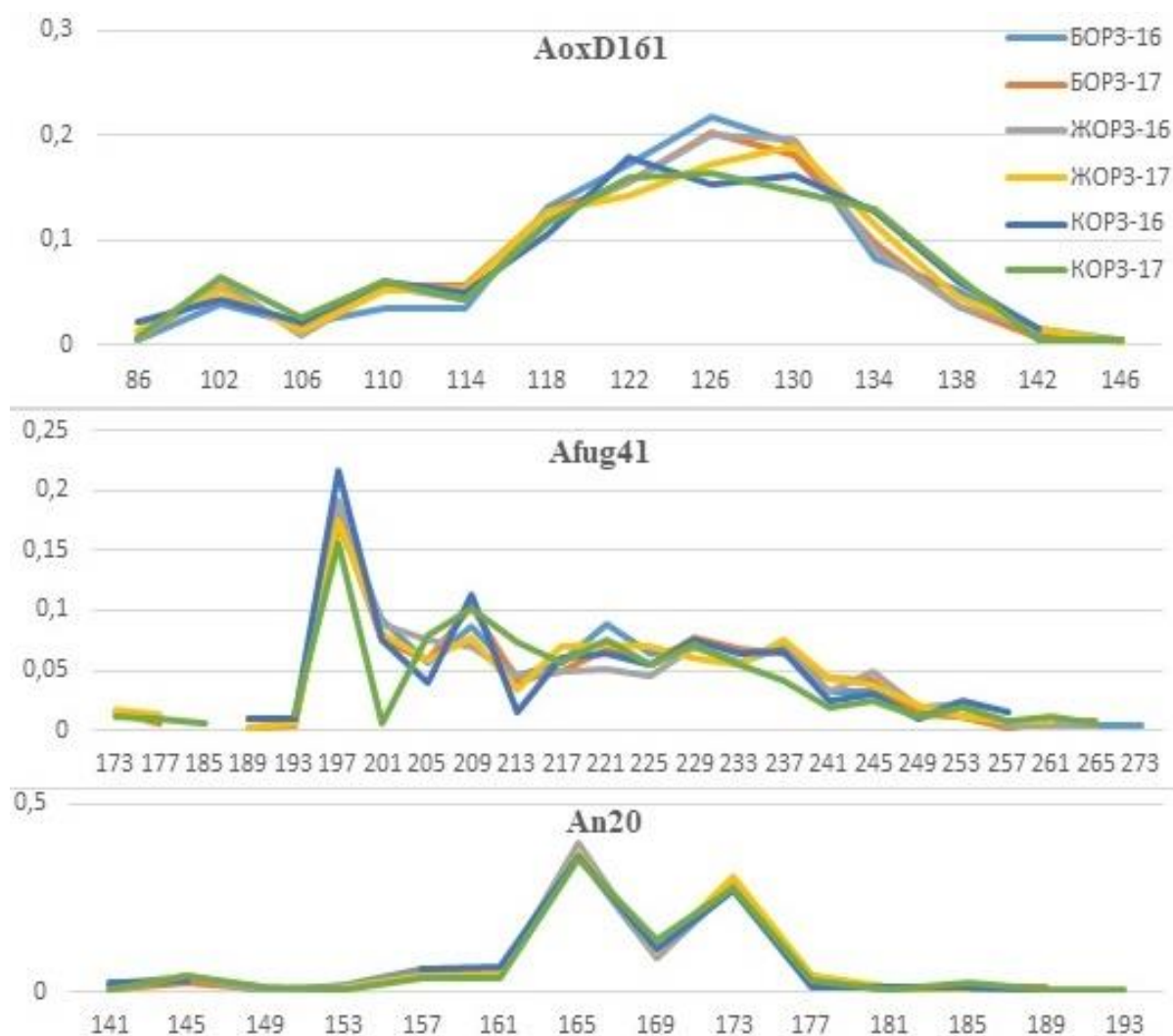


Рисунок 2 – Распределение частот аллелей производителей на БОРЗ, ЖОРЗ и КОРЗ по локусам AoxD161, Afug41, An20 за 2016-2017 гг.

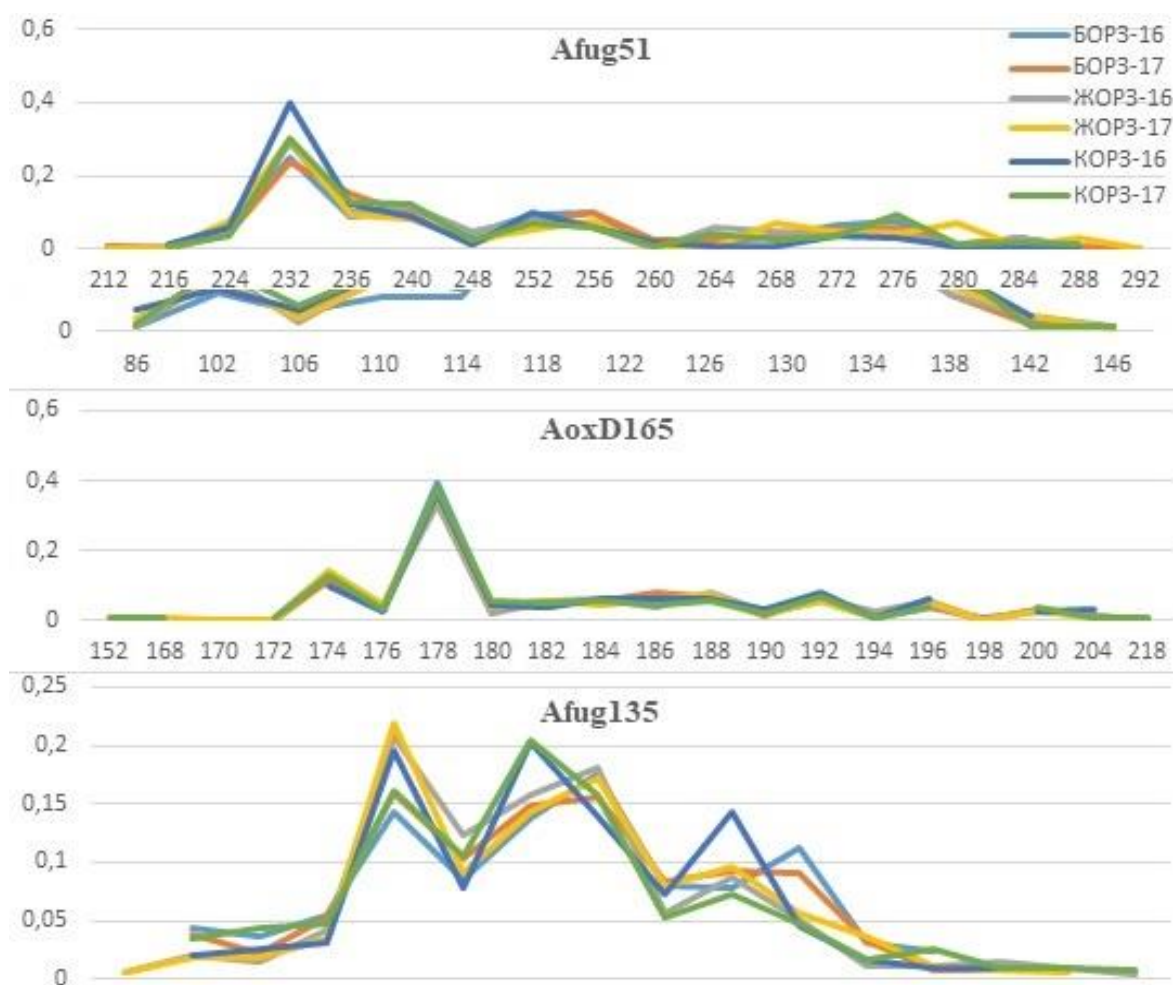


Рисунок 3 – Распределение частот аллелей производителей на БОРЗ, ЖОРЗ и КОРЗ по локусам Afug51, AoxD165, Afug135 за 2016-2017 гг.

Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК русских, персидских и сибирских осетров на основании частот митотипов BAE, GUE, BL

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

Поскольку распределение митотипов BAE, BL и GUE могло быть информативным для определения популяционной структуры вида, в рамках данной работы тест на определение митотипа провели на различных выборках, которые предположительно могли относиться к репродуктивно изолированным друг от друга группам и иметь различия в частотах данных митотипов.

Для русского осетра из азовской выборки (144 шт.) было обнаружено 98,6% GUE-митотипа и 1,4% BL-митотипа, в выборке черноморского ареала (48 шт.) все особи обладали GUE-митотипом.

В связи с тем, что мы анализировали современные выборки, собранные после 2000 года, то полученные частоты ожидаемо подтвердили данные, приведенные Тимошкиной Н.Н. и коллегами (2009) для русских осетров современной генерации азово-черноморского ареала. Авторы предположили, что небольшой процент носителей BL-митотипа, появившийся у русских осетров данного рыбохозяйственного бассейна после 1975 года, связан с искусственным зарыблением данной акватории особями из Каспийского моря, где данный митотип широко распространен.

Для изучения генофонда каспийских осетров проанализировали частоты различных митотипов в выборках как из морских сборов, так и из речных сборов озимой и яровой рас из рек Урал и Волга, а также в выборках персидских осетров из сборов в южной и северной частях Каспийского моря. Полученные результаты приведены в Таблице 1, они согласуются с частотами, описанными другими исследователями: отсутствие типично сибирского BAE митотипа, примерно треть особей с BL-митотипом у русских осетров Каспийского моря и отсутствие BL-митотипа у персидских осетров (Мюге и др., 2008; Тимошкина, 2009).

Для русских осетров треть особей с BL-митотипом выявили не только в Каспийском море, но и в речных сборах: озимой и яровой расах рек Урал и Волга. Достоверность полученных различий для 95% доверительного интервала по частотам BL-митотипа оценили в речных сборах яровой и озимой рас из рек Волги и Урала. Сравнение проводилось по одному качественному признаку для выборок разного объема с применением U-критерия по Формуле 1.

$$U = (\varphi_1 - \varphi_2) * (n_1 n_2 / (n_1 + n_2))^{1/2}, \text{ где } \varphi = 2 \arcsin(P/2). \quad (1)$$

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

Таблица 1 – Данные на основе ПЦР-теста мтДНК выборок русских и персидских осетров из р. Волги, р. Урала и Каспийского моря

Выборка	Размер выборки, шт.	Частота GUE - митотипа, %	Частота BL- митотипа, %	Частота BAE- митотипа, %
Русский осетр из р. Волги, яровая раса	144	71,5	28,5	0
Русский осетр из р. Волги, озимая раса	48	62	38	0
Русский осетр из р. Урал, яровая раса	48	66,8	33,2	0
Русский осетр из р. Урал, озимая раса	48	70,6	29,4	0
Русский осетр, морские сборы (южная часть Каспийского моря)	72	79,2	20,8	0
Персидский осетр, морские сборы (южная и средняя часть Каспийского моря)	78	100	0	0
Персидский осетр, морские сборы (северная часть Каспийского моря)	86	100	0	0

Таким образом, достоверных различий по частотам BL-митотипа в озимой и яровой расах волжского и уральского русского осетра нами обнаружено не было, и в среднем в выборках каспийского ареала (речные и морские сборы) он выявляется у 32 % особей.

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

В результате использования восьми комбинаций селективных праймеров и последующего разделения фрагментов методом капиллярного электрофореза получили 588 маркеров ядерной ДНК с молекулярной длиной от 100 до 380 п.н. Из них полиморфными оказалось 79,59%. Данная величина сходна с уровнем полиморфизма из другого исследования, где методом AFLP сравнивались виды *Acipenser naccarii*, *Acipenser transmontanus* и их гибриды (Congiu et al., 2001). Таким образом, данный уровень полиморфизма для осетров в данном методе можно считать типичным. В полученных AFLP-профилях присутствовало

небольшое количество мономорфных фрагментов, дифференцирующих сибирского и русского осетра. Различия выборок русского и персидского осетров выражались только в частотах.

Пример AFLP-профилей по одной из восьми комбинаций праймеров представлен на Рисунке 4.

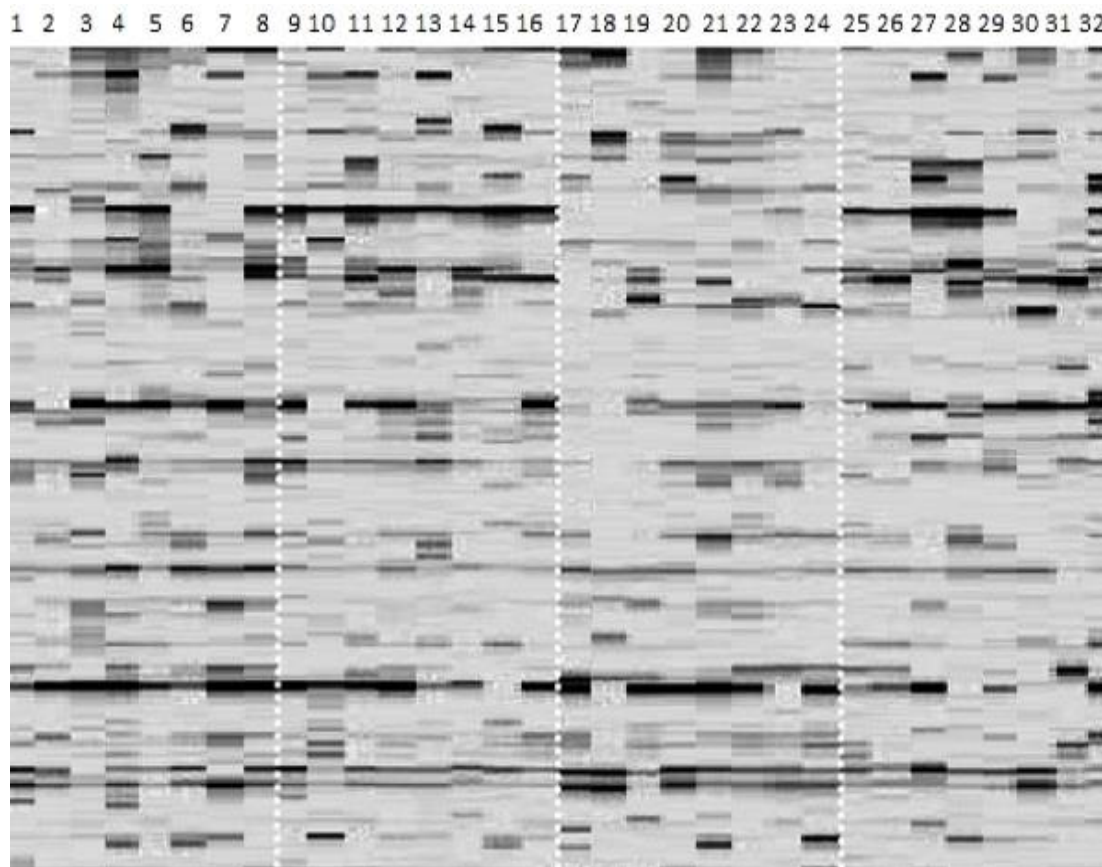


Рисунок 4 – AFLP-профили из четырех выборок осетров (90-190 bp, комбинация праймеров: EcoFAM_ACA, Msp_pr_ACC). (1-8) русские осетры из северной части Каспийского моря; (9-16) русские осетры из Азовского моря; (17-24) сибирские осетры из р. Обь; (25-32) персидские осетры из южной части Каспийского моря

Далее в программе TFPGA провели оценку генетических расстояний между следующими группами: русский осетр Азовского моря, русский осетр Каспийского моря, персидский осетр Южного Каспия, сибирский осетр (Таблица 2).

Таблица 2 – Матрица генетических расстояний по Нею. Выборки: 1 – русский осетр Каспия, 2 – русский осетр Азова, 3 – сибирский осетр, 4 – персидский осетр

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

На основании полученных данных методом UPGMA была построена дендрограмма. Для проверки достоверности топологии была рассчитана бутстрэп поддержка для каждого узла (Рисунок 5)

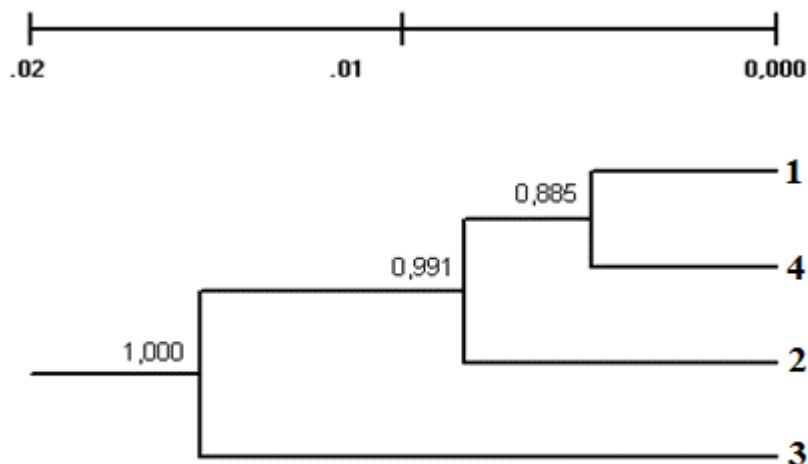


Рисунок 5 – Дендрограмма генетических дистанций; выборки: 1 – русский осетр из Северного Каспия, 2 – русский осетр из Азова, 3 – сибирский осетр, 4 – персидский осетр из Южного Каспия; значения бутстрэп поддержки приведены в узлах дендрограммы

На полученной нами дендрограмме персидский и русский осетр образуют отдельный единый кластер по отношению к сибирскому осетру. Это ожидаемый результат, так как сибирский осетр является географически изолированным и морфологически хорошо различимым видом. Примечательно, что на дендрограмме персидский осетр не образует отдельного кластера от русского осетра. Для каждого узла полученной топологии наблюдается высокий уровень бутстрэп поддержки, рассчитанный для 1000 возможных перестановок.

Соответствие морфологической и генетической дифференциации выборок персидского и русского осетра из северной части Каспийского моря

Для анализа меристических признаков в морфометрических работах нередко используется как критерий Стьюдента, так и тест Манн-Уитни для дискретных признаков. Мы применили для выборок осетров персидского и типичного русского морфотипа оба подхода и получили сходные результаты, которые показали достоверное различие между русским и персидским осетром по среднему числу спинных (SD) и боковых жучек (SL), а также отсутствие достоверного различия по среднему количеству брюшных жучек (SV).

Наиболее значимым оказалось межгрупповое различие по признаку SL. Сходные различия персидского и русского осетров по меристическим признакам отмечались в разные годы различными авторами (Бородин, 1897; Берг, 1961; Бабушкин и Борзенко, 1951; Магерамов, 1972; Путилина, 1983; Митрофанов и др., 1986; Лукьяненко и др., 1990; Артюхин, 2008).

При анализе дифференциации выборок по индексам пластических признаков применили дисперсионный анализ ANOVA. Достоверными в пределах 95% доверительного интервала оказались различия между персидским и русским осетром по индексам: C/L, Sao/C, Sno/C, Hc/L, Srci/C, SRr/C, Rci/C, Rr/C, Sp/L, Rci/Rr. Недостоверными – по R/C, aD/L и Sd/L.

По совокупности исследованных морфометрических параметров (меристических и пластических) провели анализ в пространстве главных компонент (PCA). Согласно значениям коэффициентов из исследованных нами морфологических признаков наиболее значимыми для дифференциации двух групп являются: число боковых жучек (SL), отношение антердорсального расстояния (aD) к длине тела (L), отношение ширины рыла у усиков (Srci) к длине головы (C), отношение расстояния от конца рыла до усиков (Rci) к расстоянию от усиков до рта (Rr).

Несмотря на то, что между выборками русского и персидского морфотипов по ряду пластических и меристических признаков было обнаружено достоверное различие по средним значениям, крайние значения данных признаков в выборках перекрываются.

После статистической оценки морфологической дифференциации провели генетический анализ. В случае правильной идентификации особей ожидалось следующие приблизительные частоты BL-митотипа: примерно 33% для осетров русского морфотипа и близкая к нулю частота среди осетров персидского морфотипа. Для русского морфотипа нами в итоге была получена частота BL-митотипа 34,20% и 0% – в выборке персидского морфотипа, что подтвердило целесообразность дальнейшего использования данных выборок как контрольных для оценки генетической дифференциации между русскими и персидскими осетрами.

Также на данных выборках выявили генетическую дифференциацию по аллельным частотам для 7 из 13 ядерных SNP-локусов, отобранных в рамках международного проекта «SturSNIP». 5 локусов дифференциацию не показали. 14-й локус (ядерный маркер 395AB) не показал достоверных различий на данных выборках, однако позволил с более чем 96% вероятностью отделить представителей группы русский – персидский – сибирский осетр от других видов осетровых, что подтверждает близость видов внутри данной группы, а в

будущем может быть использовано при генетической идентификации продукции осетровых гибридного происхождения.

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

Для дальнейшего исследования отобрали нуклеотидные последовательности 10 SNP-локусов с заведомо известным тетрасомным наследованием, показавших по предварительной оценке на малых выборках хорошую межгрупповую дифференциацию для русского, персидского и сибирского осетров.

Для всех 10 локусов в STRUCTURE были рассчитаны частоты для каждой выборки (Таблица 3), где цветовым переходом выделены значения частот от нулевого значения (темно-зеленый) до 1 (красный).

Таблица 3 – Частоты для каждого локуса в каждой выборке

Популяция	locus1 (C/T)		locus2 (C/T)		locus3 (C/T)		locus4 (A/G)		locus5 (A/G)	
GueCaspSouth	0,64	0,36	0,07	0,93	0	1	0,24	0,76	0,26	0,74
GueCaspNorth	0,69	0,31	0,1	0,9	0,07	0,93	0,36	0,64	0,4	0,6
GueVolga	0,71	0,29	0,07	0,93	0,05	0,96	0,27	0,73	0,52	0,48
PersCaspSouth	0,69	0,31	0,11	0,89	0	1	0,12	0,88	0,23	0,77
PersCaspNorth	0,72	0,28	0,12	0,88	0,08	0,93	0,12	0,89	0,19	0,81
GueBlackSea	0,67	0,33	0,11	0,89	0,02	0,98	0,21	0,79	0,3	0,7
GueAzov	0,72	0,28	0,12	0,88	0	1	0,14	0,86	0,41	0,59
BaeOb	0,6	0,4	0	1	0,07	0,93	0,92	0,08	0,79	0,21
Популяция	locus6 (C/T)		locus7 (C/T)		locus8 (A/G)		locus9 (A/G)		locus10 (C/T)	
GueCaspSouth	0,8	0,2	0,08	0,93	0,79	0,21	0,85	0,15	0,83	0,17
GueCaspNorth	0,86	0,14	0,27	0,73	0,73	0,27	0,54	0,47	0,89	0,11
GueVolga	0,9	0,1	0,15	0,85	0,73	0,27	0,43	0,57	0,86	0,14
PersCaspSouth	0,87	0,13	0,08	0,92	0,74	0,27	0,91	0,09	0,79	0,21
PersCaspNorth	0,94	0,06	0	1	0,72	0,28	0,93	0,07	0,58	0,42
GueBlackSea	0,88	0,12	0,05	0,95	0,76	0,24	0,92	0,08	0,36	0,64
GueAzov	0,87	0,13	0,07	0,93	0,75	0,25	0,93	0,07	0,41	0,59
BaeOb	0,37	0,63	0,83	0,17	0,29	0,71	0,03	0,97	0,43	0,57

В статистическом R-пакете MonPop для популяционно-генетических исследований построили дендрограмму генетических расстояний методом «Provesti's distance» (Рисунок 6), используемом для анализа SNP-маркеров (Prevosti, Ocafia, and Alonso, 1975).

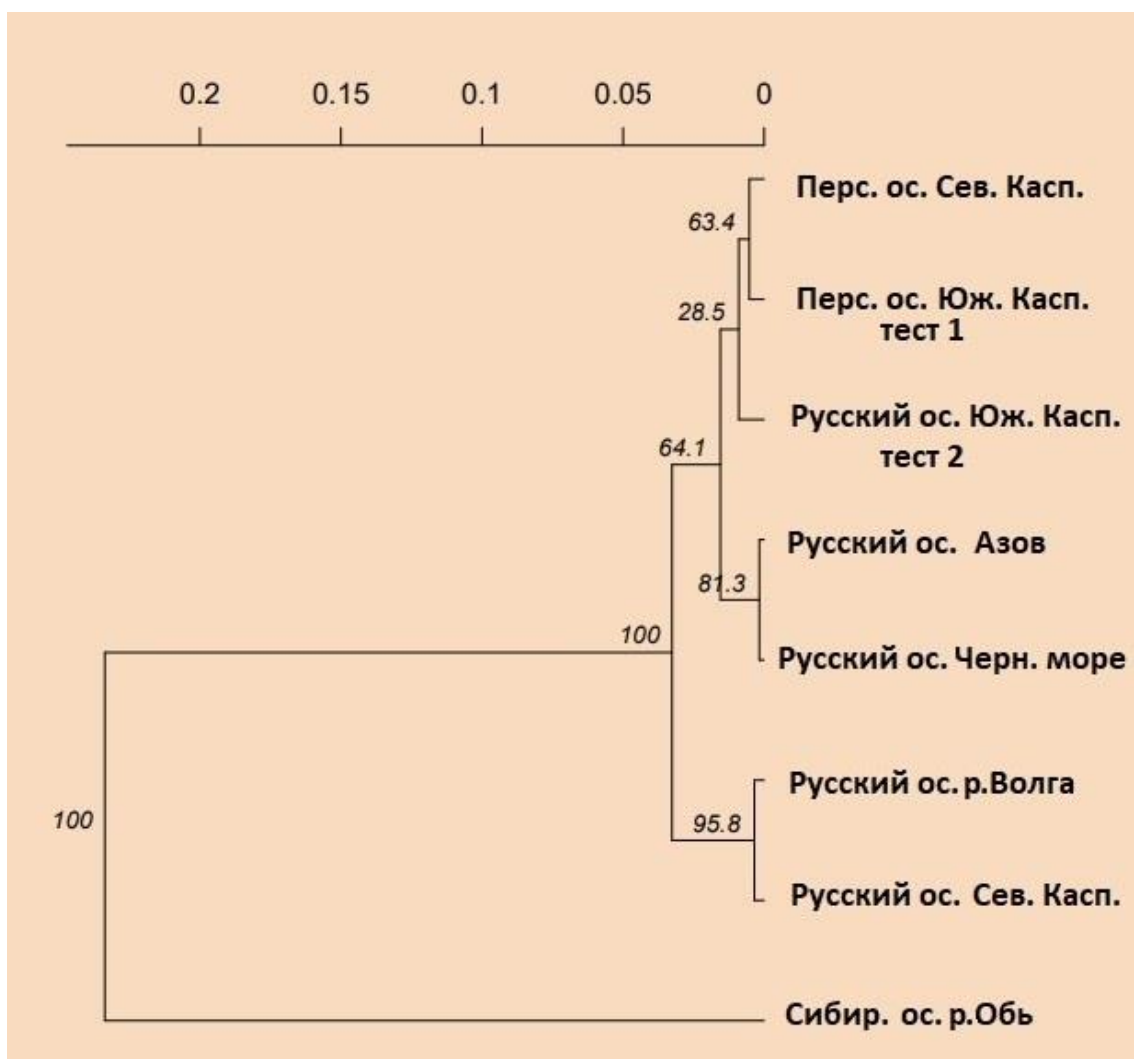


Рисунок 6 – Дендрограмма генетических расстояний с указанием в узлах бутстрэп поддержки (10 000 пермутаций), построенная в R

Самая большая дистанция со 100-процентной бутстрэп поддержкой наблюдалась между кластерами хорошо морфологически различимых групп и давней географической изоляцией – кластером сибирского осетра и объединенным кластером русский-персидский осетр, что подтвердило данные AFLP-анализа и говорит о генетической близости русского и персидского осетров. Внутри русского-персидского кластера отдельную кладу образует северо-каспийская группа выборки. В данной кладе выборка русского осетра из морских сборов Северного Каспия и выборка русского осетра из сборов р. Волги оказались ожидаемо близки.

При сопоставлении распределения южно-каспийских генотипов русских и персидских осетров выяснилось, что исследуемая выборка русского осетра из Южного Каспия имеет две вершины (бимодальная), в то время как остальные выборки, в том числе персидский осетр из Южного Каспия, имеют типичные формы нормального распределения генотипов с одной вершиной.

Это позволило предположить, что данные сборы 2003 года, переданные в коллекцию без морфометрических данных, являются смесью двух генетических типов – предположительно русского и персидского осетров.

Разделение данной выборки русского осетра из южного Каспия по результатам генотипирования с помощью значений дискриминантной функции на две группы подтвердило это предположение – одна подвыборка легла на диаграмме PCA, построенной с применением статистического пакета GenAlex6.5, в область выборок русского осетра, а другая – в область выборок персидского осетра.

Более наглядно это было показано при построении в STRUCTURE диаграммы вероятностей распределения генотипов осетров по генетическим кластерам.

Диаграмма (Рисунок 7) отображает цветом вероятность принадлежности особи тому или иному генетическому кластеру. Разрешающая способность полученной рабочей панели SNP-локусов позволила оценить такую вероятность для большинства особей. Действительно, первая выборка русского осетра из Южного Каспия состоит из смеси особей русского и персидского осетров.

K=5

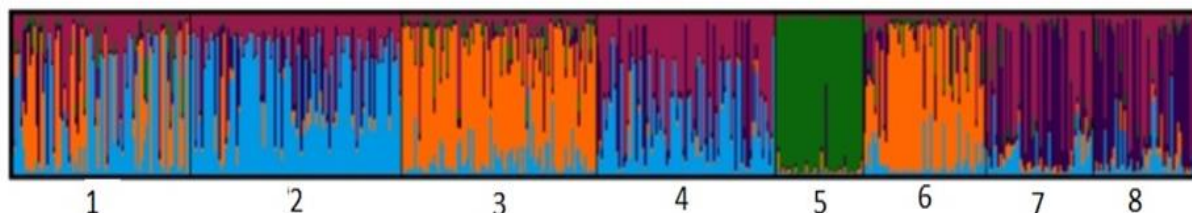


Рисунок 7 – Диаграмма вероятностей принадлежности особей осетров из Каспия к пяти генетическим кластерам; 1 – русский осетр, Южный Каспий (смешанная); 2 – персидский осетр, Южный Каспий; 3 – русский осетр, Северный Каспий (с морфометрией); 4 – персидский осетр, Северный Каспий (с морфометрией); 5 – сибирский осетр р. Обь; 6 – русский осетр из р. Волги; 7 – азовская выборка русского осетра; 8 – черноморская выборка русского осетра

Современное состояние воспроизводства Волго-Каспийской популяции русского осетра на основании данных генетического мониторинга морских и речных выловов сеголетков

После обработки в программе TRA_v.02 полученной базы генотипов молоди получили следующие результаты. Из 188 штук молоди, отобранной

случайным образом для анализа из выборки особей, выловленных в речном рейсе по Нижней Волге, удалось найти однозначную пару родителей для 133 особей, что составляет 71% от выловленной речной молоди. Всего из 208 особей, пойманных в морских рейсах, однозначно определить происхождение (приписать к ОРЗ) удалось для 152 особей, что составило 76% (Рисунок 8).

Молодь, полученная на волжских ОРЗ, показала высокий уровень полиморфизма как по количеству найденных митохондриальных гаплотипов, так и по аллельному разнообразию STR-локусов, что объясняется эффективным регулярным пополнением маточных стад domesticiрованными производителями.

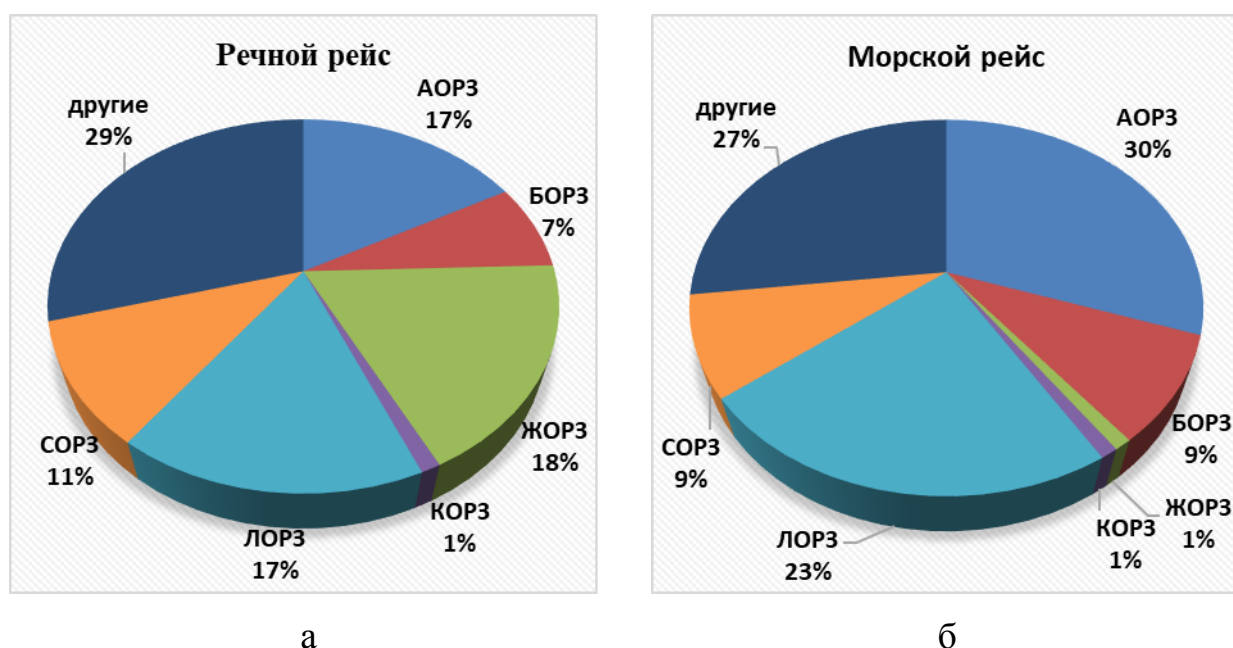


Рисунок 8 – Процентное отношение заводской молоди, выпущенной различными ОРЗ ФГБУ «Севкаспрыбвод» и молоди с неустановленным происхождением (обозначено как «другие») выловленной в речном (а) и морском (б) рейсах 2016 года

Глава 3. Обсуждение

Для первоначального изучения популяционной структуры и филогенетических связей русского осетра требовалось подтвердить, что вид сохранил природное генетическое разнообразие, несмотря на массовое искусственное воспроизводство, осуществляемое с 1960-х годов на ОРЗ Нижней Волги. Проведенные нами исследования маточных стад волжских ОРЗ показали высокий генетический полиморфизм, приближенный к полиморфизму осетров из природной среды, что позволяет виду в целом, несмотря на катастрофическое снижение численности, демонстрировать на сегодняшний

день природное генетическое разнообразие. Полученные нами данные подтверждают, что наблюдаемое высокое генетическое разнообразие волжско-каспийской популяции русского осетра поддерживается благодаря выпуску молоди от маточных стад волжских ОРЗ, содержащих высокий процент domesticiрованных диких производителей. Наши результаты подтверждают корректность популяционно-генетических исследований на современных сборах природных выборок русского осетра.

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

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

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

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

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

В исследованных нами четырех выборках из рек Волги и Урала средняя частота BL-митотипа русских осетров составила 32% и отличалась от выборки русского осетра из южной части Каспийского моря – в ней у русских осетров

BL-митотип присутствует со значительно меньшей частотой – 20,8%. Последующий анализ SNP-локусов показал, что в данной выборке присутствовали помимо русского также и ошибочно определенные персидские осетры, что привело к снижению общей частоты BL-митотипа. Эти результаты показывают также, что тест на BL-митотип может быть дополнительно применен для верификации морфологического разделения особей русского и персидского осетров.

Персидский осетр, согласно полученным нами результатам, показал не только морфологическую, но и некоторую генетическую дифференциацию от особей с типичным русским морфотипом, что в будущем может позволить разработать молекулярно-генетические методы по его идентификации. Однако выявленная генетическая дифференциация не является значительной и не позволяет ему при расчете кластеризации образовать самостоятельную кладу по отношению к популяциям русского осетра. Все найденные генетические различия для персидского осетра носят уровень различий в частотах. Морфологический анализ ряда меристических и пластических признаков показал достоверное различие между русским и персидским осетрами лишь по средним значениям, однако крайние значения признаков перекрываются. Очевидно, что обособление персидских осетров от русских осетров, согласно нашим данным, произошло в более поздний период, чем дивергенция русского осетра на каспийскую и азово-черноморскую популяции, что позволяет считать вид персидский осетр очень молодой группой. Однако следует отметить, что обсуждение таксономического ранга персидского осетра не входило в задачи данной работы.

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

Заключение

В результате данной работы были исследованы как дикие популяции русского осетра, так и маточные стада на волжских ОРЗ, влияющих на состояние генофонда русского осетра. Была выявлена популяционная структура вида и были проанализированы филогенетические связи с близкими видами –

персидский и сибирский осетр. Новые найденные молекулярно-генетические маркеры могут быть в дальнейшем использованы для решения прикладных задач в рамках международной конвенции СИТЕС.

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

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

ВЫВОДЫ

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации, соответствующие требованиям ВАК, включенные в международные системы цитирования (SCOPUS, Web of science)

1. **Sergeev A.A.** Sturgeon conservation genomics: SNP discovery and validation using RAD sequencing/ Ogden R, Gharbi K, Mugue N, Martinsohn J, Senn H, Davey JW, Pourkazemi M, McEwing R, Eland C, Vidotto M, Sergeev A, Congiu L. // *Molecular Ecology*. – 2013 – Jun 22 (11) – P. 3112-23.
2. **Sergeev A.A.** Evolutionary relations and population differentiation of *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, *Acipenser persicus* Borodin, and *Acipenser baerii* Brandt. // *F1000Research*. – 2016. – 5:2807.
3. **Sergeev A.A.** A new marker, isolated by ddRAD sequencing, detects Siberian and Russian sturgeon in hybrids / Havelka, M., Boscari, E., Sergeev, A., Mugue N., Congiu, L., Arai, K. // *Animal Genetics*. – 2019. – Feb 50(1). – P.115-116.

Публикации в других изданиях

4. **Сергеев А.А.** Исследование каспийской популяции русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) с помощью молекулярно-генетических методов / Сергеев А.А., Расторгуев С.М., Барминцева А.Е. // Материалы международного конгресса студентов. Аспирантов и молодых ученых «Перспектива-2007», Нальчик. – 2007. – Секция «Биология». – Т. IV. – С. 58.
5. **Сергеев А.А.** Дифференциация популяций русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) по генетическим маркерам митохондриальной и ядерной ДНК в сравнении с персидским осетром (*Acipenser persicus* Borodin) и сибирским осетром (*Acipenser baerii* Brandt) // Ломоносов – 2009: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. – Секция «Биология», подсекция «Генетика». – М.: Моск. гос. университет, 2009. – С. 102.

6. **Sergeev A.A.** Population genetic differentiation of Russian, Persian and Siberian Sturgeon species by using mitochondrial and nuclear genetic marker // XIV European Congress of Ichthyology, Liège, Belgium, 3-8 July 2012. – P. 51.

7. **Sergeev A.A.** Evolutionary relations and population differentiation of *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt., *Acipenser persicus* Borodin and *Acipenser baerii* Brandt / Sergeev A.A., Mugue N.S. // Evolution-2014. Raleigh, North Carolina, USA, 20–24 June 2014. – P. 348.

8. **Sergeev A.A.** Genetic monitoring of natural sturgeon spawning in the lower Volga for the period 2017-2018 / Alexey A. Sergeev, Anna E. Barmintseva, Natalia I. Chavychalova, Maria E. Tolochkova, Nikolai S. Mugue // XVI European Congress of Ichthyology (ECI XVI) Lausanne, Switzerland, 2-6 September 2019. – Jan 2019. – Frontiers in Marine Science.