

© Н. Н. Тимошкина<sup>1</sup>,  
Д. И. Водолазский<sup>1</sup>,  
А. В. Усагов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Южный научный центр РАН,  
Ростов-на-Дону;

<sup>2</sup> Южный федеральный  
университет, Ростов-на-Дону

✿ **Уникальность и высокая коммерческая ценность реликтовой группы осетровых рыб стимулировали исследования их генетического полиморфизма. В обзоре рассмотрены основные молекулярно-генетические маркеры, используемые для оценки генетической изменчивости; обсуждены их достоинства и недостатки, приведены примеры их применения, в основном, на *Acipenseriformes* Евразии. Кратко освещены проблемы генетического анализа полиплоидных видов.**

✿ **Ключевые слова:** генетический полиморфизм; *Acipenseriformes*; полиплоидия; молекулярно-генетические маркеры.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ВНУТРИ- И МЕЖВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА ОСЕТРОВЫХ РЫБ (*ACIPENSERIFORMES*)

Осетровые рыбы (отряд *Acipenseriformes*), до недавнего времени широко распространенные в Северном полушарии, известны как реликтовая группа (более 200 млн. лет). Высокая коммерческая ценность, стимулирующая интенсивный вылов, и потеря части ареала обитания вследствие строительства гидротехнических сооружений, препятствующих проходу половозрелых особей к местам нереста в верховья рек, привели к повсеместному резкому снижению численности *Acipenseriformes*. По данным IUCN 24 вида этого отряда имеют статус редких, а некоторые из них, находятся на грани исчезновения. Угрожающее состояние природных популяций осетровых рыб послужило основанием для включения их в Приложение СITES, — организации, регламентирующей международную торговлю редкими видами флоры и фауны (Raymakers, 2006).

*Acipenseriformes* характеризуются высокой экологической пластичностью и морфологической изменчивостью. Исторически классификация осетровых рыб базируется на изменчивости морфологических признаков, из многообразия которых чаще всего используют меристические признаки, так как они наименее изменчивы в онтогенезе рыб (Vecsei et al., 2004). Пластические признаки, характеризующие форму тела и относительные размеры его частей, наиболее информативны при индивидуальной идентификации. Однако они существенно изменяются в зависимости от возраста, размера, пола, сезона и среды обитания. В ранее проведенных исследованиях с различным успехом использовали морфологические, физиологические и экологические особенности для дискриминации родов, видов и популяций *Acipenseriformes* (Берг, 1948; Бабурина, 1957; Цветненко, 1993; Шляхов, 1994; Debus et al., 2002; Kyhard et al., 2002; Подушка, 2003, 2007; Артюхин, 2008; Калмыков и др., 2009). Отметим, что варьирование фенотипа под воздействием факторов внешней среды (модификационная изменчивость) часто ставит под сомнение результаты популяционных исследований на основании морфологических различий.

Для филогенетических и таксономических исследований, а также в целях сохранения и восстановления запасов осетровых рыб в дополнение к морфологии все чаще используют молекулярно-генетические методы. Оценка внутри- и межвидового генетического полиморфизма необходима для исследования микроэволюционных процессов, закономерностей их динамики во времени и пространстве, определения популяционно-генетической структуры, степени генетического разнообразия природных и искусственных популяций и, как следствие, понимания причин происходящих в них изменений. В основной части статьи приведен сравнительный анализ результатов ис-

Поступила в редакцию 15.10.2009  
Принята к публикации 05.02.2010

следований осетровых рыб Евразии за последние десять лет, полученных с помощью молекулярно-генетических маркеров.

### 1.1. ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОСЕТРОВЫХ РЫБ

Генетический анализ осетровых рыб имеет ряд особенностей, обусловленных, главным образом, организацией их генома. Во-первых, *Acipenseriformes* характеризуются медленной молекулярной эволюцией (Brown et al., 1996; Birstein, 1997). Результаты сравнительных исследований нуклеотидных последовательностей митохондриальных и ядерных генов свидетельствуют, что скорость замен в этой группе почти в два раза ниже, чем у костистых рыб Teleostei (Krieger, Fuerst, 2002). Этот феномен предположительно связан с полиплоидным происхождением осетровых рыб.

Хрящевые ганоиды объединяют полиплоидные многохромосомные виды рыб, кариологически разделенные на три группы: первая группа с 112–146 хромосомами (например, белуга *Huso huso*, стерлядь *Acipenser ruthenus*, севрюга *A. stellatus*), вторая группа с 250–270 (русский осетр *A. gueldenstaedtii*, сибирский осетр *A. baerii*, адриатический осетр *A. naccarii*), третья — с 360–370 хромосомами (*A. brevirostrum*) (Vasil'ev, 2009). Впервые предположение о полиплоидности *Acipenseriformes* было высказано в работах, выявивших большое содержание ДНК, а также возможность разложения кариотипов в 4-хромосомные группы (Васильев, 1985; Birstein, 1993). Сегодня существует две гипотезы видообразования у хрящекостных *Chondrostei*. Первая из них базируется на автополиплоидии общего 60-хромосомного предка около 300 млн. лет назад с последующими вторичными дубликациями генома дивергировавших видов (Birstein et al., 1997). Вторая гипотеза «автоматической полиплоидизации» предполагает аллоплоидную схему происхождения осетровых рыб, путем образования одно-двуполых комплексов различной пloidности с периодической межвидовой гибридизацией (Vasil'ev, 2009).

Современные виды *Acipenseriformes*, очевидно, находятся на разных уровнях диплоидизации. Именно возвращением к структурно-функциональной диплоидности генома авторы объясняли отсутствие квадрилентных или октовалентных структур в мейотических кариотипах сперматоцитов белого осетра *A. transmontanus* (2n ~270 хромосом) (Van Eenennaam et al., 1998). Позже анализ пloidности *Acipenseriformes*, проведенный Людвигом с соавт. с помощью 6 микросателлитных локусов, показал, что виды с 120 хромосомами функционально диплоидные, виды с 240 — тетраплоидные, с 480 — октаплоидные (Ludwig et al., 2001). Следовательно, относительно анцестрального кариотипа осетровые виды 4-, 8- и 12-пloidные, а с учетом диплоидизации эти же виды 2-, 4- и 6-пloidные.

Полиплоидность генома осетровых рыб поставила перед исследователями задачу развития статистического анализа генетических данных, так как подавляющее большинство используемых математических моделей и компьютерных программ (TFPGA, Genepop, Microsatellite analyzer (MSA), Arlequin) основываются на предположении о диплоидном наследовании и частотах гаплотипов, соответствующих равновесию Харди-Вайнберга. Возможный методический прием для упрощения статистической обработки заключается в использовании алгоритмов, разработанных для доминантных AFLP, RAPD и ISSR маркеров (Rodzen et al., 2004). В работе, посвященной исследованию популяционной дифференциации русского осетра, оценку частот аллелей тетраплоидных микросателлитных локусов проводили методом «минус-аллеля», осуществляющегося без учета типа гетерозигот (Тимошкина и др., 2009). Кроме того, активно ведется поиск ядерных маркеров, которые наследуются по диплоидной схеме (Ludwig et al., 2001; Pyatskowitz et al., 2001; McQuown et al., 2002).

### 1.2. БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Общие принципы метода разделения белков путем электрофореза были заложены еще в 1950-х гг. (Галь и др., 1982). Суть данных методов заключается в том, что белковые макромолекулы, различающиеся по суммарному электростатическому заряду и/или по молекулярному весу, фракционируют электрофорезом в различных гелях-носителях. Наследование аллозимных маркеров, обычно, соответствует кодоминантному типу, т. е. метод позволяет учитывать гомо- и гетерозиготные особи.

Основным ограничением метода электрофоретического разделения белковых молекул является его относительно низкая разрешающая способность (Hallerman, Beckman, 1988). Более того, в силу своей высокой функциональной значимости подавляющее большинство белковых маркеров не относятся к селективно нейтральным (Левонтин, 1978). Следовательно, выявляемая изменчивость существенно ограничена приспособленностью к условиям среды. Среди методических трудностей отметим и строгие требования к качеству образцов: на результаты метода сильное влияние оказывает исходная степень деградации биологического образца и вид ткани. Тогда как во многих случаях немногочисленность и ценность осетровых рыб не позволяет произвести полноценный отбор проб. Разработка более чувствительных, селективно нейтральных методов ДНК-типирования постепенно вытесняет белковый электрофорез.

Ранее, с помощью электрофореза белков крови был изучен генетический полиморфизм некоторых осетровых рыб (Рябова и др., 2008). Исследования севрюги,

белуги и русского осетра из Азовского и Каспийского моря показали различия между популяциями по частотам четырех полиморфных белков (Чихачев, Цветненко, 1984). Ряд авторов отмечали высокий полиморфизм белков сыворотки крови каспийской севрюги (Лукьяненко и др., 1977; Рябова и др., 1995; Pourkazemi, 1996). Однако зависимость от функционального статуса организма и выявляемый уровень полиморфизма белков крови ограничивает их информативность для дискриминации популяций и даже видов осетровых рыб (Лукьяненко и др., 1977; Лукьяненко и др., 2002). Так, в работе Кузьмина (1991), исследовавшего с помощью изоферментов малат-дегидрогеназы (MDH) популяционную структуру *A. ruthenus* из рек Дон и Кама, а также *A. baeri* из реки Обь, не удалось дифференцировать эти два вида, продемонстрировавших высокую гомологию по аллелям локуса MDH.

### 1.3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

Разнообразные методы оценки ДНК-полиморфизма в зависимости от поставленных целей успешно используют на различных уровнях: от индивида и популяции до отрядов и надотрядных категорий. Во многих случаях переменные ДНК-маркеры позволяют обнаружить генетические различия, не распознаваемые методами электрофореза белков (Smith, McVeagh, 2000).

Начало анализа структуры ДНК было положено в 1970–1980 гг. после разработки метода прямого определения нуклеотидной последовательности. Сегодня наиболее распространен метод ферментативного секвенирования по Сэнгеру с использованием дидеокситерминаторов синтеза цепи ДНК (Sanger et al., 1977). Однако обладая наибольшей диагностической мощностью, секвенс-анализ из всех ДНК-методов более дорогой и трудоемкий. Позже был разработан рестрикционный анализ полиморфизма длин фрагментов (RFLP — Restriction Fragment Length Polymorphism), основанный на специфичном разрезании молекулы ДНК ферментами — рестриктазами (Lansman et al., 1981). Полиморфизм ДНК, выявляемый RFLP методом, позволил дифференцировать 17 из 22 изученных видов *Acipenseriformes*, за исключением близкородственных видов *A. gueldenstaedtii*, *A. persicus* и трех видов рода *Scaphirhynchus* (Ludwig et al., 2002).

В настоящее время широко используемым инструментом ДНК-анализа стал метод полимеразной цепной реакции (ПЦР или PCR — Polymerase Chain Reaction), разработанный в 1985 г. (Saiki et al., 1985). Чувствительность ПЦР позволяет успешно анализировать деградированную ДНК из музейных и археологических проб, что дает возможность восстанавливать исходный ареал обитания и популяционную структуру осетровых, ставших чрезвычайно редкими видами (de la Hera et al., 2004; Тимошкина и др., 2007; Garrido-Ramos et al., 2009).

Оценка полиморфизма ДНК зависит от выбранного типа маркеров. Так, последовательности, кодирующие первичную структуру белков, напрямую связаны с фенотипом и не являются селективно нейтральными с точки зрения отбора (исключая случаи синонимичных замен). Селективная нейтральность маркера становится особенно важной в вопросе эволюционной истории популяций. В противном случае филогенетические древа популяций, основанные на данных о частотах аллелей и гаплотипов, окажутся статистически смещенными (Zhivotovsky, Feldman, 1995). Ниже приведена краткая характеристика некоторых ДНК-маркеров, которые используют для оценки генетического полиморфизма.

#### 1.3.1. RAPD-ПОЛИМОРФИЗМ ДНК

В основе метода RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) лежит ПЦР-амплификация анонимных участков ДНК с помощью одного, обычно короткого (до 10 пар нуклеотидов, пн) праймера произвольной последовательности, который индуцирует в каждой реакции синтез до нескольких десятков фрагментов ДНК случайной локализации (Williams et al., 1993). Возможность исследовать полиморфизм всего генома без предварительного знания конкретных последовательностей ДНК составляет главное преимущество RAPD-анализа. Высокий уровень полиморфизма, определяемый RAPD-методом, является достаточно информативным в популяционных исследованиях, для выявления скрытого генетического полиморфизма в линиях и близкородственных видах, а также индивидуальной идентификации (Barmintsev et al., 2001; Алтухов, 2003; Зеленина и др., 2006).

Следует отметить, что RAPD-маркеры наследуются как доминантные признаки, что не позволяет отличить доминантную гомозиготу от гетерозиготы и рецессивную гомозиготу от неамплифицированной последовательности. Для преодоления этого недостатка метода был разработан оригинальный математический аппарат, с помощью которого учитывают частоту рецессивного условного «нуль-аллеля» (Zhivotovsky, 1999).

Из отрицательных сторон заслуживает внимания низкая воспроизводимость RAPD-анализа, обусловленная неспецифичностью праймеров, индуцирующих амплификацию полос различной интенсивности, образование гетеродуплексов и т. п. (Weising et al., 2005). Ограничивает применение данной методики и высокие требования к качеству матрицы и потенциальная негомологичность RAPD-бэндов (на электрофореграмме один фрагмент может содержать разные нуклеотидные последовательности одного размера). Отметим, что при разработке метода подчеркивалась потенциальная возможность построения с помощью RAPD-маркеров карт сцепления с конкретными локусами. Тем не менее, успехи в этой области более чем скромны, к тому же такие работы требуют довольно затратного масштабного скрининга. Так, например, с целью выявления ДНК-маркеров,

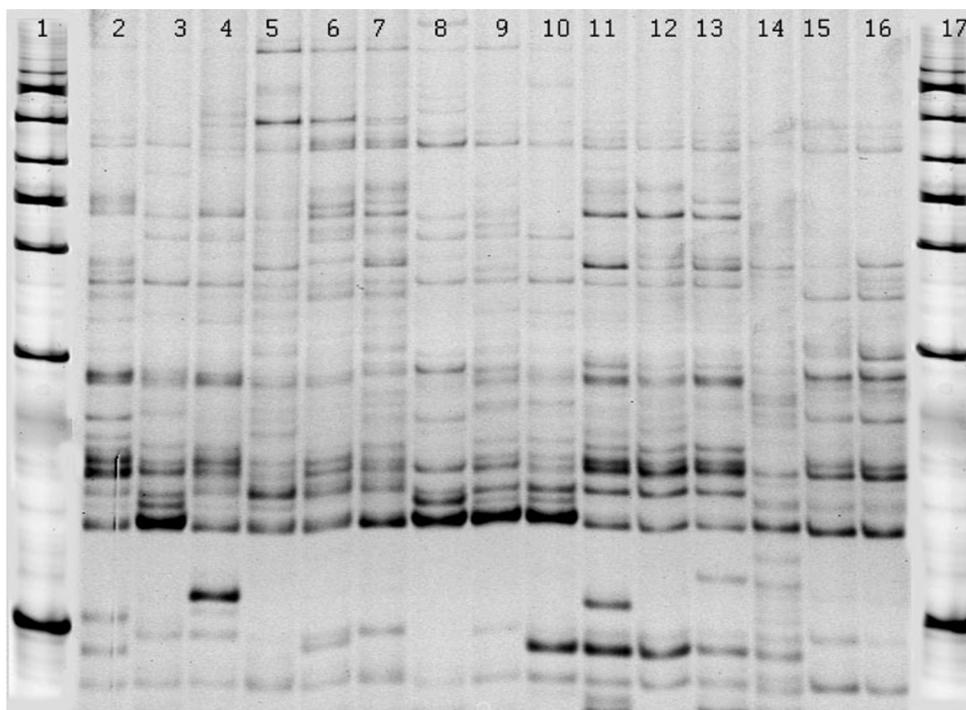


Рис. 1. AFLP-спектры осетровых видов рыб, полученные с помощью селективных праймеров Msp-CGC. На дорожках 1,17 — маркеры молекулярной массы ДНК PstI/HindIII (Fermentas), 2–4 — *A. gueldenstaedtii*; 5–7 — *A. baerii*; 8–10 — *H. huso*, 11–13 — *A. ruthenus*, 14–16 — *A. stellatus*

диагностирующих пол белуги, были использованы 310 случайных праймеров различной структуры, однако из 4146 полученных бэндов ни один не был сцеплен с полом (Keyvanshokoo et al., 2007).

В исследованиях осетровых рыб RAPD в основном применяется на видовом уровне, когда дифференциация основывается на обнаружении ряда видоспецифичных бэндов. С помощью восьми различных RAPD праймеров были дискриминированы шесть видов осетровых рыб (Cominci et al., 1998). Позже, используя RAPD, наблюдали только незначительные различия между близкородственными видами *A. persicus* и *A. gueldenstaedtii* (Gharaei et al., 2005). В работе Рожкован и др. (2008) для идентификации четырех межвидовых гибридов от скрещивания *A. schrenckii*, *A. baerii* и *A. ruthenus* успешно использовали 10 RAPD праймеров. Следует отметить, что идентификация межвидовых гибридов осетровых особенно актуальна в условиях их интенсивного разведения в аквакультуре.

### 1.3.2. AFLP-полиморфизм длины амплифицированных фрагментов ДНК

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) можно рассматривать как комбинацию RAPD и RFLP методов. Суть AFLP-анализа заключается в избирательной амплификации фрагментов, полученных при рестрикции тотальной ДНК (Vos et al., 1995). Несмотря на другой принцип реализации, метод AFLP, как и RAPD,

амплифицирует анонимные участки преимущественно некодирующей ДНК. AFLP-маркеры также обладают менделевским наследованием доминантного типа. Поэтому для описываемой методики характерны те же преимущества и недостатки, указанные выше для RAPD. Однако, в отличие от RAPD-анализа, AFLP обладает лучшей воспроизводимостью результатов (Mueller and Wolfenbarger, 1999). В работе Конгю с соавт. (Congiu et al., 2002) впервые обсуждалась возможность идентифицировать гибриды осетровых на основании сравнения AFLP-фингерпринтов исследуемой выборки с эталонными спектрами родительских видов. На рисунке 1 показаны AFLP-спектры некоторых видов осетровых рыб. Широкому применению AFLP-маркеров препятствует громоздкость и длительность процедуры, существенно снижающие производительность анализа.

### 1.3.3. Анализ полиморфизма SNP

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) — полиморфизм единичного нуклеотидного сайта. Метод представляет собой идентификацию аллельных вариантов (замен) однонуклеотидного сайта какой-либо ДНК последовательности с помощью автоматизированного секвенса и/или микрочипов (microarrays), представляющих собой ДНК-микрочипы с нанесенными пробками кДНК.

Достоинства SNP-маркеров являются в то же время и их недостатками. Невысокая информативность отдельного биаллельного SNP-локуса (Vignal et al., 2002) при-

Таблица 1

**Сравнительная характеристика ДНК-маркеров с позиции их практического использования для идентификации осетровых рыб**

Метод	Данные об идентификации (публикации)			Наличие контрольных образцов	Стоимость 1 анализа *	Продолжительность анализа
	видовой	популяционной	индивидуальной			
RFLP	+			Да (GenBank)	++	5 часов
RAPD	+			Да	+	1 день
AFLP	+			Да	++	1 день
SNP (mtDNA)	+			Да	+	1 день
Секвенирование	+	+		Да (EMBL, GenBank)	+++	1–2 дня
2-праймерная ПЦП (мтДНК)	+			Нет	+	3 часа
STR	+	+	+	Да (публикации)	++	5 часов

Примечание: \* — предполагаемые затраты на исследование одного образца (+ — около 10 евр., ++ — 20 евр., +++ — более 20 евр.), включена только стоимость реактивов.

водит к необходимости использовать большой пул маркеров. Высокая плотность и особенности локализации в геноме требуют строгого отбора локусов на независимое наследование и селективную нейтральность. Для разработки и апробации SNP-маркеров необходимы значительные затраты времени и средств, что ограничивает их применение в области систематики и филогении.

На основании секвенсов участка митохондриального гена цитохрома b были разработаны SNP-маркеры для видовой дифференциации ряда осетровых видов (Rehbein, 1997). Неудобство метода заключается в необходимости постановки сложной системы нескольких ПЦП реакций на одну пробу ввиду амплификации только коротких ПЦП-фрагментов (обычно менее 250 пн). Однако, несмотря на это, метод использовали для матрилинейной идентификации близкородственных видов *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. naccarii* и *A. persicus* (Ludwig et al., 2000). Отметим, что разработка SNP-маркеров для большинства осетровых видов сегодня осложнена недостаточным количеством исследуемых выборок из природных популяций.

#### 1.3.4. Анализ микросателлитной ДНК

Микросателлитные последовательности (STR — Short Tandem Repeats или SSR — Simple Sequence Repeats) относятся к умеренно повторяющейся (сателлитной) ядерной ДНК, широко распространенной по всему геному. В классе рыб микросателлитный локус встречается приблизительно на каждые 10 000 пн, тогда как минисателлитный локус — на каждые 1 500 000 пн (Wright, 1993). Один из вариантов классификации STR-локусов приведен в работе Уркхарта с соавт. (Urquhart et al., 1994). Разнообразие структуры STR-маркеров продемонстрировано во многих работах на осетровых рыбах (King et al., 2001; Zane et al., 2002; Welsh et al., 2003; Bork et al., 2008; Forlane et al., 2008). Например, некоторые локусы зеленого осетра *A. fulvescens* имеют ал-

лели, состоящие из совершенных или простых повторов  $(CATC)_n$ ,  $(GATA)_n$ ,  $(AAAC)_n$ ,  $(CA)_n$ ; их регулярность не прерывается. Возникновение точковых мутаций приводит к более сложной структуре —  $(GATA)_n GACA(GATA)_n$ . Наконец, встречаются сложные аллели, составленные из двух и более типов повторов —  $(AAAC)_6(AC)_2(AAAC)_8$  и т. д.

Консервативность фланкирующих последовательностей, на базе которых разрабатываются STR-праймеры, и сходство организации микросателлитов позволяют использовать одни и те же праймеры и протоколы анализа для близких видов, что, несомненно, является преимуществом метода (May et al., 1997; Zane et al., 2002). Однако вероятность мутации в сайтах праймеров приводит к феномену неамплифицируемого, так называемого, «нуль-аллеля», что может привести к фиксации ложной гомозиготности по данному локусу.

STR-маркеры относятся к рекомбинантным геномным селективно нейтральным маркерам, подчиняющимся законам наследования Менделя. Выявляемый с их помощью уровень ДНК полиморфизма на порядок выше аллозимной изменчивости (см. табл. 1, Алтухов и Салменкова, 2002). Такая существенная разница обусловлена большей скоростью возникновения мутаций в микросателлитных локусах, составляющей около  $10^{-2}$ – $10^{-6}$  на локус за поколение против  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  у структурных генов (Schlötterer, 2000). Быстрое накопление популяционно-специфичных мутаций в STR-локусах, позволяет не только анализировать популяционную структуру вида, но и идентифицировать принадлежность отдельной особи к конкретной популяции (Hansen et al., 2001). Данные STR-анализа часто используют для оценки внутривидовых процессов, таких как миграция, эффекты «горлышка бутылки» (Cognuet, Luikart, 1996; King, 2000).

На фоне медленной молекулярной эволюции в отряде *Acipenseriformes* высокий полиморфизм по STR-локусам обеспечивает успешное решение задач по

дискриминации близкородственных осетровых видов, например, *A. medirostris* и *A. transmontanus* (Bork et al., 2008). Для видовой идентификации севрюги *A. stellatus* был предложен микросателлитный локус Afu-39, который содержит аллель (111 пн), отсутствующий у 10-ти других видов осетров (Jennekens et al., 2001). Однако анализ по Afu-39 оказался не применим для *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, которые не амплифицировали ПЦР-продукт с предложенными праймерами.

Исследования внутригрупповой изменчивости нескольких десятков особей адриатического осетра (*A. naccarii*), проведенные с помощью STR и митохондриальных маркеров (Zane et al., 2002), показали дифференцирование согласно географическому происхождению особей этого исчезающего вида. STR-анализ позволил дискриминировать адриатического и русского осетра, несмотря на наличие у нескольких особей *A. naccarii gueldenstaedtii*-подобных митотипов.

Смит с соавт. (Smith et al., 2002) на основании анализа STR-локусов, описанных для белого и атлантического осетра (*A. oxyrinchus*), изучили популяционную структуру белого осетра (*A. transmontanus*) и выявили ее изменения, связанные с фрагментацией некогда единой популяции *A. transmontanus* вследствие строительства плотин. С помощью полиморфизма микросателлитных локусов была также успешно определена внутривидовая дифференциация североамериканского *A. fulvescens* (McQuown et al., 2003), *A. oxyrinchus* из Мексиканского залива (Dugo et al., 2004), понтокаспийского *A. gueldenstaedtii* (Тимошкина и др., 2009).

### 1.3.5. Анализ полиморфизма ядерных генов

Методы, основанные на сравнительном анализе первичной нуклеотидной последовательности ядерных генов (частичные и полные; интронов и экзонов) успешно используют в филогении животных. В случае с осетровыми рыбами секвенс-анализ по причине сложной организации ядерного генома (многохромосомность, различные уровни пloidности, микрохромосомы, дополнительные В хромосомы) имеет ряд ограничений. Наиболее изучен ядерный ген *18S rRNA*. Бирштейн с соавт. (Birstein et al., 1997) определили его частичную последовательность (230 пн) у восьми видов отряда и показали, что данный сегмент имеет небольшую разрешающую способность из-за низкой степени межвидовых различий. Дальнейшие исследования этого гена выявили у осетров необычное явление индивидуальной изменчивости (множество вариантов последовательности дублированного гена), что связывают с присутствием дополнительной ДНК в геноме хрящевых ганоидов из-за их полиплоидного происхождения (Krieger, Fuerst, 2002). В серии работ на *A. fulvescens* было проанализировано тридцать секвенсов гена *18S rRNA*, которые содержали 17 различных вариантов последовательностей, различавшихся индивидуальными нуклеотидными заменами и вставками/

делециями. На филогенетическом древе, построенном по этим данным, осетры формировали монофилитическую ветвь, отдельную от веслоносов и/или других рыб. Однако эти последовательности оказались бесполезны для идентификации видов или межвидовых отношений (см. рис. 4 в Krieger, Fuerst, 2002). В более позднем исследовании (Krieger et al., 2006), внутрииндивидуальная изменчивость *18S rRNA* гена была найдена у 14 евразийских видов *Acipenseriformes*, но она отсутствовала у китайского веслоноса, что послужило основанием предполагать более раннее разделение семейств осетров и веслоносов.

Данные исследований уже 24-х видов *Acipenseriformes* по двум полиморфным сегментам гена *18S rRNA* не позволили провести филогенетический анализ. Однако отдельные мутации вставка/делеция, наблюдаемые в данных последовательностях, коррелировали с положительными эволюционными отношениями видов. Например, *A. sturio* и *A. oxyrinchus* образовывала единую группу. Близкородственные отношения этих видов и подвидов *A. o. oxyrinchus* и *A. o. desotoi* подтверждали присутствием/отсутствием уникальной последовательности, трех уникальных полиморфных сайтов и недостатком изменчивости по другому сайту, вариабельному для всех других видов *Acipenser* и *Huso* (Ludwig et al., 2001; Fontana et al., 2001; Krieger et al., 2008).

### 1.3.6. Анализ полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК)

Геном митохондрий животных изучен гораздо подробнее ядерного, и этому есть объективные причины. Во-первых, размеры мтДНК не превышают 20 000 пн, необходимых для кодирования 37 генов (рис. 2). мтДНК весьма компактно организована, ее кодирующие гены не содержат интронов и разделены генами тРНК. Единственный некодирующий участок молекулы содержит регуляторные элементы, ответственные за репликацию и транскрипцию мтДНК, — это контрольный регион (CR — control region) или D-петля (D-Loop — Displacement Loop). Размер указанной области мтДНК в силу наличия tandemных повторов различной копийности может варьировать в значительных пределах, в том числе и у осетровых рыб (Водолажский и др., 2008).

Во-вторых, количество молекул митохондриальной ДНК варьирует от 2 до 10 000 копий на клетку, и это позволяет формально отнести мтДНК к повторяющейся. Ковалентно замкнутая молекула мтДНК более устойчива к внешним воздействиям, что в совокупности с многокопийностью дает хорошую возможность исследовать археологические и музейные образцы (Рынза и др., 2006; Garrido-Ramos et al., 2009).

В-третьих, митохондриальная ДНК эволюционирует в среднем гораздо быстрее, чем сопоставимые ядерные последовательности, и мутации в ней происходят от 6 до 17 раз чаще по сравнению с соответствующими генами ядерной

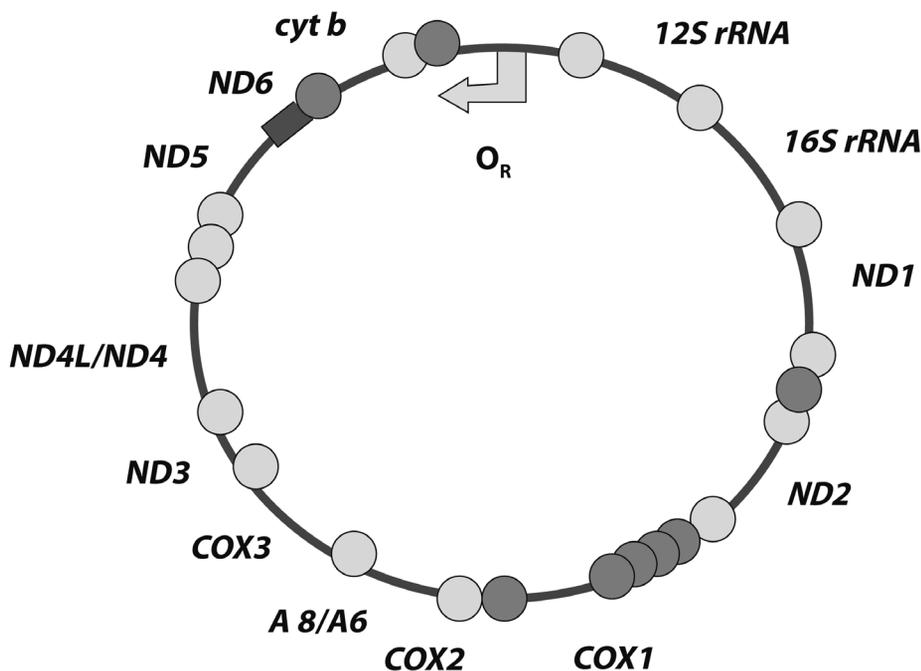


Рис. 2. Схема организации митохондриального генома. Обозначение генов: *A8/A6* кодируют субъединицы 6 и 8 АТФазы; *cyt-b* — цитохром b; *COX1–COX3* — субъединицы цитохром с-оксидазы; *ND1–ND6* — субъединицы НАДН-дегидрогеназного комплекса; *12S, 16S rRNA* — рибосомальные РНК; *ND4L* — часть субъединицы 4 НАДН-дегидрогеназы, транскрибируемой с легкой цепи;  $O_R$  — точка начала репликации; светлыми кружками обозначены гены транспортных РНК (тРНК), транскрибируемые по часовой стрелке и темными кружками — тРНК, транскрибируемые против часовой стрелки

ДНК (Brown et al., 1986). Скорость накопления мутаций самой мтДНК различается для разных областей молекулы. Более высокий уровень изменчивости в некодирующем регионе D-петли определяется наличием повторов либо точечных мутаций (Roe et al., 1985). Однако сама область контрольного региона неоднородна по этому показателю (Douzery, Randi, 1997; Saccone et al., 1991).

Наиболее часто исследования митохондриального генома проводят прямым секвенированием. Для скрининговых исследований применяют рестрикционный анализ и специфичную дву-праймерную ПЦР.

Следует заметить, что митохондриальные гены не подчиняются законам Менделя и наследуются у большинства организмов, размножающихся половым путем, только по материнской линии (матрилинейно), и не подвергаясь рекомбинации. В связи с этим анализ мтДНК не позволяет провести индивидуализирующее исследование, но дает возможность идентифицировать определенный матрилинейный ряд.

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, 2003). Соответственно и эффективный размер популяции для мтДНК составляет только  $\frac{1}{4}$  от аналогичной оценки для ядерных генов (Nei, Tajima, 1981). Поэтому при резком сокращении численности

популяции анализ изменчивости мтДНК может раньше выявлять эффекты случайного дрейфа генов и «горлышка бутылки». Кроме того, следы этих процессов, а также изоляции популяции, имевшей место в прошлом, сохраняются в мтДНК на протяжении более длительного периода по сравнению с ядерной ДНК.

Важная особенность анализа мтДНК выделяет его по сравнению с аллозимными и полилокусными ДНК маркерами, а именно, митотипы можно выстраивать в сеть последовательных эволюционных шагов через минимальные числа пошаговых мутаций, необходимых для перехода от одного митотипа к другому. Сегодня уже разработаны многочисленные компьютерные программы, позволяющие на основе сравнения первичных последовательностей мтДНК реконструировать направления филогенеза (Mega, Paup, Arlequin).

В исследованиях осетровых рыб полиморфизм мтДНК чаще всего используют для видовой дифференциации и филогении. Для этих целей наиболее изучены области D-петли и гена цитохрома b (Birstein et al., 2000; Walsh et al., 2001; Корниенко и др., 2003; Doukakis et al., 2005; Мюге и др., 2008). Исследование малочисленного вымирающего коротконосого осетра *A. brevirostrum* продемонстрировало высокую популяционную структурированность этого анадромного вида, обитающего в реках восточного побережья Северной Америки. Причем достоверные меж-

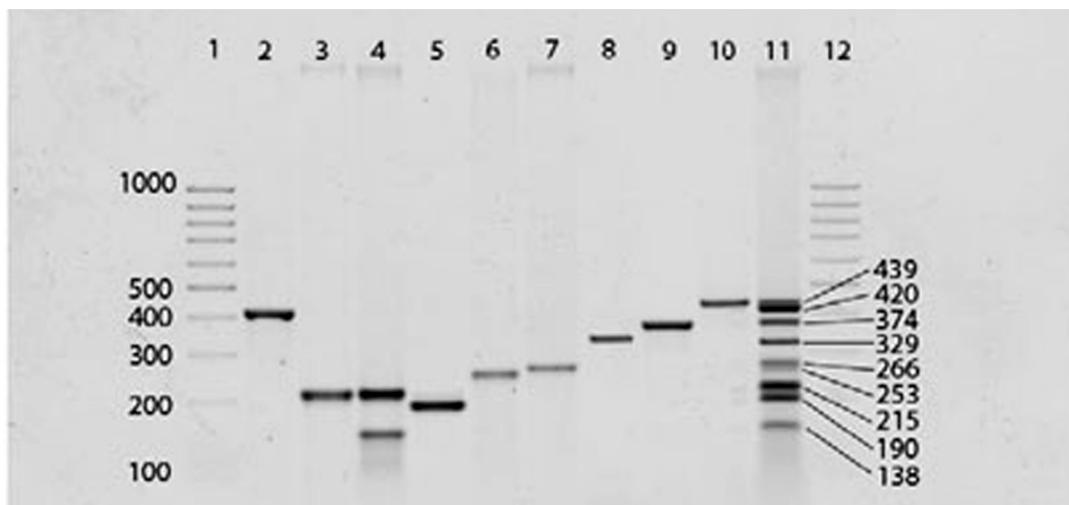


Рис. 3. Визуализация ПЦР-продуктов для разных видов осетров в агарозном геле (Мюге и др., 2008). На дорожках 1–12 — маркеры молекулярной массы ДНК; 2, 3 — *A. gueldenstaedtii*; 4 — *A. baerii*; 5 — *A. ruthenus*; 6 — *A. schrenckii*; 7 — *A. stellatus*; 8 — *A. nudiventris*; 9 — *H. huso*; 10 — *H. dauricus*; 11 — маркер масс ПЦР-продуктов осетровых

популяционные отличия на высоком уровне значимости были определены по секвенсам D-петли, в то время как морфологический анализ 11 признаков не показал дифференциации популяций (Walsh et al., 2001). Исследования первичной последовательности гена цитохрома b русского осетра продемонстрировали высокий полиморфизм азовской популяции — 8 митотипов у 24-х особей (Корниенко и др., 2003). В работе Водолажского и др. (2008) показана сложная структура D-петли *A. gueldenstaedtii*, где присутствуют как минимум TAS-1 и TAS-2 последовательности (Termination Associated Sequence — ассоциированная с терминацией репликации последовательность), причем количество TAS-2 последовательностей пропорционально количеству тандемных повторов. Тандемные повторы D-петли у разных видов осетровых рыб имеют протяженность от 74 до 83 пн, часто высокополиморфны, количественно варьируют не только между особями, но и в разных тканях одной особи (гетероплазмия) (Ludwig et al., 2000; Водолажский и др., 2008).

Видоспецифичную двухпраймерную ПЦР, основанную на присутствии диагностических нуклеотидных различий в последовательности мтДНК, успешно использовали для идентификации *H. huso*, *A. stellatus* и *A. gueldenstaedtii* (Birstein et al., 1998). Для каждого из этих видов, по крайней мере, одна пара специфичных праймеров, соответствовала диагностическим нуклеотидам. Т. е. появление продукта амплификации в реакции с одной из видоспецифичных пар праймеров, позволяет идентифицировать эти виды. Возможность выделения мтДНК из продуктов переработки осетровых (балык, икра и т. п.), простота исполнения, дешевизна и быстрота анализа обеспечили широкое применение данного метода в контроле над торговлей осетровыми рыбами. В случае, сомнительных

результатов видоспецифичной ПЦР необходимо проведение дополнительного секвенирования фрагмента контрольного региона. Однако в более поздней работе этой группы исследователей было показано, что разработанный метод из-за перекрывания профилей мтДНК не позволил точно идентифицировать *A. gueldenstaedtii* и дифференцировать этот вид от близко родственных видов *A. baerii*, *A. naccarii* и *A. persicus* (Ludwig et al., 2002; Birstein et al., 2000). Недавнее определение полной последовательности мтДНК понтокаспийских видов осетровых (Rastorguev et al., 2008) позволяет значительно расширить возможности методов, основанных на митохондриальных маркерах. Например, в указанной работе была дана оценка разрешающей способности различных областей митохондриального генома для видовой и популяционной идентификации. Эти же авторы, исследуя полиморфизм нуклеотидной последовательности D-петли мтДНК осетровых рыб (*A. gueldenstaedtii*, *A. persicus*, *A. baerii*, *A. ruthenus*, *A. schrenckii*, *A. stellatus*, *A. nudiventris*, *H. huso*, *H. dauricus*), разработали тест-систему, которая позволяет идентифицировать восемь из девяти изученных видов (рис. 3). Предлагаемый метод не дискриминирует только русского и персидского осетров, которые обнаруживают в большой степени гомологичные митохондриальные гаплотипы (Мюге и др., 2008).

#### 1.4. КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ

Полиплоидность, многохромосомность, сравнительно медленная скорость эволюции структурных генов осетровых рыб не позволяют отдать предпочтение одному виду ДНК-маркеров. Для увеличения достоверности

результатов исследований генетической дифференциации *Acipenseriformes* часто используют ядерные и митохондриальные маркеры в комплексе. Например, анализ высоко полиморфных RAPD-маркеров не выявил различий между тремя географически изолированными популяциями *A. gueldenstaedtii*, одновременно достоверная внутривидовая дифференциация была обнаружена с помощью STR-маркеров и диагностического митотипа (Тимошкина и др., 2009).

Несколько работ было выполнено по определению популяционной структуры малочисленного *A. naccarii* из реки По и Буна с помощью маркеров митохондриальной (D-петля) и ядерной ДНК (STR и AFLP). Предварительное сообщение о видоспецифичной замене в D-петле, которая дискриминировала два экземпляра *A. naccarii* (река По) от *A. gueldenstaedtii* (Birstein et al., 2000), не было подтверждено в более позднем исследовании (Ludwig et al., 2003). Однако особи *A. naccarii* из реки Буна были легко идентифицированы по 13 диагностическим заменам в D-петле, одной замене в гене цитохрома b мтДНК и нескольким STR-аллелям, а так же по частоте AFLP-маркеров (Ludwig et al., 2002, Ludwig et al., 2003).

Показательны результаты работ, обнаруживших события гибридизации и интрогрессии у нескольких видов осетровых рыб. По данным Трапа (Tranah et al., 2004), крупномасштабные события межвидовой гибридизации имели место в трех популяциях *S. albus* и *S. platyrhynchus*. Основываясь на частичной последовательности гена цитохрома b, Бирштейн с соавт. (Birstein et al., 1998) высказали предположение о гибридной природе значительной части каспийской популяции русского осетра, так как обнаруженный у 30 % особей митотип характеризовался высокой гомологией с мтДНК сибирского осетра *A. baerii* (Jennekens et al., 2000). Однако последовавший вывод о недавнем появлении этого митотипа вследствие межвидового скрещивания при искусственном воспроизводстве не подтвердили в дальнейшем AFLP и STR-анализ указанных видов, который не выявил подобного сходства между русским осетром с «baerii-like» митотипом и сибирским осетром. Дальнейшие исследования единичных нуклеотидных замен D-петли показали неидентичность митотипов сибирского осетра и «baerii-like» митотипа русского осетра (Мюге и др., 2008). По данным Тимошкиной и др. (2009) и Войновой и др. (Voyanova et al., 2008), «baerii-like» митотип является диагностическим маркером для каспийской популяции *A. gueldenstaedtii*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературы свидетельствует, что ДНК-маркеры чаще используют для разработки методов видовой идентификации осетровых рыб (табл. 1). Тем не менее, наиболее информативными для дискриминации

видов являются метод секвенирования мтДНК и разработанные на его основе дупраймерная ПЦП и RFLP. STR-анализ более востребован для популяционной и индивидуальной идентификации.

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. 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.

Более медленная молекулярная эволюция осетровых видов, по сравнению с костистыми рыбами определяет проблему предела разрешающей способности метода секвенирования структурных генов, ограничивая генетическое дифференцирование и его количественное определение. Именно по этим причинам идет активная разработка для *Acipenseriformes* новых маркеров микросателлитной ДНК, демонстрирующих чрезвычайно высокий уровень полиморфизма. Использование системы STR-маркеров дает возможность решить вопросы индивидуальной идентификации и популяционной принадлежности особей, оценки эффективности искусственного воспроизводства через определение репродуктивного вклада производителей в генофонд жизнеспособного потомства. Перспективность STR-анализа побудила к поиску микросателлитных локусов с диплоидным типом наследования у полиплоидных по своей природе осетровых видов.

Таким образом, использование ДНК маркеров в течение последнего десятилетия позволило определить внутривидовую дифференциацию многих видов отряда *Acipenseriformes*, что имеет большое значение для планирования вылова, искусственного размножения и в конечном итоге сохранения этих древних рыб.

## Литература

1. Алтухов Ю. П., Салменкова Е. А., 2002. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. Т. 38. № 9. С. 1173–1195.
2. Алтухов Ю. П., 2003. Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ «Академкнига». 431 с.
3. Артюхин Е. Н., 2008. Осетровые (экология, географическое распространение и филогения). СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та. 137 с.
4. Бабурина Е. А., 1957. Развитие глаз и их функции у осетра и севрюги // Труды института морфологии животных. Вып. 20. С. 148–186.

5. Берг Л. С., 1948. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. М.-Л. : Изд-во АН СССР. Ч. 1. 467 с.
6. Васильев В. П., 1985. Эволюционная кариология рыб. М.: Наука. 300 с.
7. Водолажский Д. И., Конриенко И. В., Войнова Н. В., 2008. Гипервариабельность региона D-петли митохондриальной ДНК русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* (*Acipenseriformes*, *Acipenseridae*) // Вопр. ихтиологии. Т. 48. С. 266–275.
8. Галь Э., Медеши Г., Верецкеи Л. 1982. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир. 448 с.
9. Животовский Л. А., 2006. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Вестник ВОГиС. Т. 10. № 1. С. 74–96.
10. Зеленина Д. А., Хрусталева А. М., Волков А. А., 2006. Сравнительное исследование популяционной структуры и определение популяционной принадлежности нерки (*Oncorhynchus nerka*) Западной Камчатки с помощью RAPD-PCR и анализа полиморфизма микросателлитных локусов // Генетика. Т. 42. С. 693–704.
11. Калмыков В. А., Рубан Г. И., Павлов Д. С., 2009. О популяционной структуре стерляди *Acipenser ruthenus* (*Acipenseridae*) из нижнего течения Волги // Вопр. ихтиологии. Т. 49. С. 380–388.
12. Корниенко И. В., Войнова Н. В., Чистяков В. А. и др., 2003. Полиморфизм первичной последовательности сегмента гена цитохрома и митохондриальной ДНК азовской популяции *Acipenser gueldenstaedtii* // Вопр. ихтиологии. Т. 43. С. 73–77.
13. Кузьмин Ю. В., 1991. Сравнительное исследование аллозимов мышечной малат дегидрогеназы в популяциях сибирского осетра *Acipenser baeri* р. Обь и стерляди *A. ruthenus* р. Дон и Камы // Вопр. ихтиологии. Т. 31. С. 139–144.
14. Левонтин Р. С., 1978. Генетические основы эволюции. М.: Мир. 351 с.
15. Лукьяненко В. И., Гераскин П. П., Баль Н. В., 1977. Гетерогенность и полиморфизм гемоглобина у двух видов рода *Huso* // Докл. АН СССР. Т. 237. С. 994–997.
16. Лукьяненко В. И., Лукьяненко В. В., Хабаров Н. В., 2002. Гетерогенность и полиморфизм функционально специализированных белков крови мигрирующих рыб на примере северо-каспийской популяции русского осетра во время морского и речного периодов жизни. 2. Гемоглобины // Докл. РАН. Сер. Биология. № 4. С. 494–500.
17. Мюге Н. С., Барминцева А. Е., Расторгуев С. М. и др., 2008. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика. Т. 44. С. 1–7.
18. Подушка С. Б., 2003. О систематическом положении азовского осетра // Научно-технический бюллетень лаборатории ихтиологии ИНЭНКО. СПб. № 7. С. 19–44.
19. Подушка С. Б., 2007. Сводка данных по биологии, промыслу и воспроизводству азовской белуги // Научно-технический бюллетень лаборатории ихтиологии ИНЭНКО. СПб. № 12. С. 16–73.
20. Рожкован К. В., Челомина Г. Н., Рачек Е. И., 2008. Молекулярная идентификация и особенности генетического разнообразия межвидовых гибридов амурского осетра (*Acipenser schrenckii* × *A. baerii*, *A. baerii* × *A. schrenckii*, *A. schrenckii* × *A. ruthenus* и *A. ruthenus* × *A. schreckii*) по данным изменчивости мультилокусных RAPD-маркеров // Генетика. Т. 44. С. 1453–1460.
21. Рынза Е. Т., Тимошкина Н. Н., Мухоньков М. М., 2006. Видовая идентификация археологического материала осетровых рыб с помощью метода полимеразной цепной реакции // Сб. науч. тр. АзНИИРХ. Ростов-на-Дону: «МедиаПресс». С. 289–292.
22. Рябова Г. Д., Климонов В. О., Шишанова Е. И. 2008. Генетическая изменчивость природных популяций и domestцированных стад осетровых России (атлас аллозимов). М: Россельхозакадемия. 94 с.
23. Рябова Г. Д., Офицеров М. В., Шишанова Е. И., 1995. Исследование связи между аллозимной изменчивостью и некоторыми компонентами приспособленности у севрюги *Acipenser stellatus* (*Pallas*) // Генетика. Т. 31. С. 1679–1692.
24. Тимошкина Н. Н., Барминцева А. Е., Усатов А. В., Мюге Н. С., 2009. Внутривидовой генетический полиморфизм русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) // Генетика. Т. 45. № 9. С. 1250–1259.
25. Тимошкина Н. Н., Рынза Е. Т., Усатов А. В., 2007. ДНК-идентификация «baerii-like» митотипа в азовской популяции русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) // Сб. науч. тр. Съезда Украинского общества генетиков и селекционеров. Киев: Логос. Т. 1. С. 326–329.
26. Цветненко Ю. Б., 1993. Эффективность и генетические последствия интродукции севрюги *Acipenser stellatus* из Каспийского в Азовский бассейн // Вопр. ихтиологии. Т. 33. С. 382–387.
27. Чихачев А. С., Цветненко Ю. Б., 1984. Оценка влияния искусственного воспроизводства и интродукции на генетическую структуру популяции азовских осетровых // Воспроизводство рыбных запасов Каспийского и Азовского морей. М.: ВНИРО. С. 114–125.
28. Шляхов В. А., 1994. Оценка численности днепровского стада осетра в северо-западной части Черного моря // Труды ЮгНИРО. Керчь. Т. 40. С. 50–55.
29. Barmintsev V. A., Chudinov O. S., Abramova A. B., 2001. Molecular and biological methods of identification and certification of sturgeons and their products // Fish Farm. Fish. Vol. 1. P. 70–71.

30. Birstein V. J., Doukakis P., DeSalle R., 2000. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: forensic and evolutionary implications // *Cons. Gen.* Vol. 1. P.81–88.
31. Birstein V. J., Doukakis P., Sorkin B., DeSalle R., 1998. Population aggregation analysis of three caviar-producing species of sturgeons and implications for the species identification of black caviar // *Conserv. Biol.* Vol. 12. P.766–775.
32. Birstein V. J., Hanner R., DeSalle R., 1997. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches // *Environ Biol Fish.* Vol. 48. P.127–155.
33. Birstein V. J., Poletav A. I., Goncharov B. F., 1993. The DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry // *Cytometry.* Vol. 14. P.377–383.
34. Bork K., Drauch A., Israel J. A. et al. 2008. Development of new microsatellite primers for green and white sturgeon // *Conserv. Genet.* Vol. 9. P.973–979.
35. Brown J. R., Beckenbach K., Beckenbach A. T., Smith M. J., 1996. Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (*Acipenser*) // *Genetics.* Vol. 142. P.525–535.
36. Brown G., Gadaleta G., Pepe G., Saccone C. and Sbisà E., 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA // *J. Mol. Biol.* Vol. 192. P.503–511.
37. Comincini S., Lanfredi M., Rossi R., Fontana F., 1998. Use of RAPD markers to determine the genetic relationships among sturgeons (*Acipenseridae*, *Pisces*) // *Fish. Sci.* Vol. 64. P.35–38.
38. Congiu L., Fontana F., Patarnello T., Rossi R., Zane L., 2002. The use of AFLP in sturgeon identification // *J. Appl. Ichth.* Vol. 18. P.268–289.
39. Cornuet J. M., Luikart G., 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data // *Genetics.* Vol. 144. P.2001–2014.
40. De la Herra R., Robles F., Martinez-Espin E., 2004. Genetic identification of western Mediterranean sturgeons and its implication for conservation // *Conserv. Genet.* Vol. 5. P.545–551.
41. Debus L., Winkler M., Billard R., 2002. Structure of micropyle surface on oocytes and caviar grains in sturgeons // *Int. Rev. Hydrobiol.* Vol. 87. P.585–603.
42. Doukakis P., Birstein V. J., De Salle R., 2005. Intraspecific structure within three caviar-producing sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*, *A. stellatus* and *Huso huso*) based on mitochondrial DNA analysis // *J. Appl. Ichth.* Vol. 21. P.457–460.
43. Dugo M. A., Kreiser B. R., Ross S. T. et al., 2004. Conservation and management implications of fine-scale genetic structure of Gulf sturgeon in the Pascagoula River, Mississippi // *J. Appl. Ichth.* Vol. 20. P.243–251.
44. Douzery E., Randi E., 1997. The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content // *Mol. Biol. and Evol.* Vol. 14. P.1154–1166.
45. Fontana F., Tagliavini J., Congiu L., 2001. Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancements and perspectives // *Genetica.* Vol. 111. P.359–373.
46. Forlani A., Fontana F., Congiu L., 2008. Isolation of microsatellite loci from the endemic and endangered Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // *Conserv. Genet.* Vol. 9. P.461–463.
47. Garrido-Ramos M. A., Robles F., de la Herran R. et al., 2009. Analysis of Mitochondrial and Nuclear DNA Markers in Old Museum Sturgeons Yield Insights About the Species Existing in Western Europe: *A. sturio*, *A. naccarii* and *A. oxyrinchus* // *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons* / Eds. R. Carmona et al.: Springer Science + Business Media B. Vol. P.25–49.
48. Gharaei A., Pourkazemi M., Rezvani S., Mojazi Amiri B., 2005. Genetic differences; and resemblance between *Acipenser persicus* and *Acipenser gueldenstaedtii* by means of RAPD technique // *Iran. Sci. Fish. J.* Vol. 14. P.91–102.
49. Hansen M., Kenchington E., Nielsen E. E., 2001. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers // *Fish and Fisheries.* Vol. 2. P. 93–112.
50. Jenneckens I., Meyer J.-N., Debus L. et al., 2000. Evidence of mitochondrial DNA clones of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, caught in the River Volga // *Ecol. Lett.* Vol. 3. P.503–508.
51. Jenneckens I., Meyer J. N., Horstgen-Schwark G. et al., 2001. A fixed allele at microsatellite LS-39 is characteristic for the black caviar producer *Acipenser stellatus* // *J. Appl. Ichth.* Vol. 17. P.39–42.
52. Keyvanshokoo S., Pourkazemi M., Katbassi M. R., 2007. The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*) // *J. Appl. Ichth.* Vol. 23. P.1–2.
53. King J. P., Kimmel M., Chakraborty R., 2000. A power analysis of microsatellite-based statistics for inferring past population growth // *Mol. Biol. and Evol.* Vol. 17. P.1859–1868.
54. King T. L., Lubinski B. A., Spidle A. P., 2001. Microsatellite DNA variation in Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and cross-species amplification in the *Acipenseridae* // *Cons. Gen.* Vol. 2. P.103–119.
55. Krieger J., Fuerst P. A., 2002. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order *Acipenseriformes* // *Mol. Biol. Evol.* Vol. 19. N 6. P.891–897.
56. Krieger J., Hett A. K., Fuerst P. A. et al., 2006. Unusual intraindividual variation of the nuclear 18S rRNA gene is widespread within the *Acipenseridae* // *J. Hered.* Vol. 97. P.218–225.

57. Krieger J., Hett A. K., Fuerst P. A., Artyukhin E., Ludwig A., 2008. The molecular phylogeny of the order *Acipenseriformes* revisited // J. Appl. Ichth. Vol. 24. P. 36–45.
58. Kynard B., Zhuang P., Zhang L., Zhang T., Zhang Z., 2002. Ontogenetic behavior and migration of Volga River Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, with a note on adaptive significance of body color // Environmental Biology of Fishes. Vol. 65. P. 411–421.
59. Lansman R. A., Shade R. O., Shapiro J. F., Avise J. C., 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations III. Techniques and potential applications // J. Mol. Evol. Vol. 17. P. 214–226.
60. Ludwig A., May B., Debus L., Jenneckens I., 2000. Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser, Huso and Scaphirhynchus*) // Genetics. Vol. 156. P. 1933–1947.
61. Ludwig A., Belfiore N. M., Pitra C. et al., 2001. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser, Huso and Scaphirhynchus*) // Genetics. Vol. 158. P. 1203–1215.
62. Ludwig A., Debus L., Jenneckens I., 2002. A molecular approach for trading control of black caviar // Int. Rev. Hydrobiol. Vol. 87. P. 661–674.
63. Ludwig A., Congiu L., Pitra C. et al., 2003. Nonconcordant evolutionary history of maternal and paternal lineages in Adriatic sturgeon // Mol. Ecol. Vol. 12. P. 3253–3264.
64. May B., Krueger C. C., Kincaid H. L., 1997. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus* // Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 54. P. 1542–1547.
65. McQuown E., Gall G. A. E., May B., 2002. Characterization and inheritance of six microsatellite loci in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) // Trans. Am. Fish. Soc. Vol. 131. P. 299–307.
66. McQuown E., Krueger C. C., Kincaid H. L. et al., 2003. Genetic comparison of lake sturgeon populations: Differentiation based on allelic frequencies at seven microsatellite loci // F. Great. Lakes Res. Vol. 29. N 1. P. 3–13.
67. Mueller U. G., Wolfenbarger L. L., 1999. AFLP genotyping and fingerprinting // Trends Ecol. Evol. Vol. 14. P. 389–394.
68. Nei M., Tajima F., 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases // Genetics. Vol. 105. P. 207–217.
69. Pyatskowitz J. D., Krueger C. C., Kincaid H. L., May B., 2001. Inheritance of microsatellite loci in the polyploid derivative lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) // Genome. Vol. 44. P. 185–191.
70. Rastorguev S., Muge N., Volkov A., Barmintsev V., 2008. Complete mitochondrial DNA sequence analysis of Ponto-Caspian sturgeon species // J. Appl. Ichth. Vol. 24. P. 46–49.
71. Raymakers C., 2006. CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: its role in the conservation of *Acipenseriformes* // J. Appl. Ichth. Vol. 22. P. 53–65.
72. Rehbein H., 1997. Fischartbestimmung von Caviar durch Protein- und DNA-Analyse // Info. Fischw. Vol. 44. P. 27–30.
73. Rodzen J. A., Famula T. R., May B., 2004. Estimation of parentage and relatedness in the polyploid white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using a dominant marker approach for duplicated microsatellite loci // Aquaculture. Vol. 232. P. 165–182.
74. Roe B. A., Ma D. P., Wilson R. K., Wong J. F., 1985. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome // J. Biol. Chem. Vol. 260. P. 9759–9774.
75. Saccone C., Pesole G., Sbisa E., 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure–function model and evolutionary pattern // J. Mol. Evol. Vol. 33. P. 83–91.
76. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F. et al., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // Science. Dec. 20. Vol. 230. P. 1350–1354.
77. Schlötterer C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA // Chromosoma. V. 109. P. 365–371.
78. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Ibid. Vol. 74. P. 5463–5467.
79. Smith P., McVeagh M., 2000. Allozyme and microsatellite DNA markers of toothfish population structure in the Southern Ocean // J. Fish Biol. Vol. 57. P. 72–83.
80. Smith C. T., Nelson R. J., Pollard S. et al., 2002. Population genetic analysis of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in the Fraser River // J. Appl. Ichth. Vol. 18. P. 307–312.
81. Tranah G., Campton D. E., May B., 2004. Genetic evidence for hybridization of pallid and shovelnose sturgeon // Heredity. Vol. 95. P. 474–480.
82. Urquhart A., Kimpton C. P., Downes T. J., Gill P., 1994. Variation in short tandem repeat sequences — a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers // Int. J. Leg. Med. Vol. 107. P. 13–20.
83. Van Eenennaam A. L., Murray J. D., Medrano J. F., 1998. Synaptonemal complex analysis in spermatocytes of white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very high chromosome number // Genome. Vol. 41. P. 51–61.
84. Vasil'ev V. P., 2009. Mechanisms of Polyploid Evolution in Fish: Polyploidy in Sturgeons // Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons / Eds. R. Carmona et al.: Springer Science + Business Media B. Vol. P. 97–117.

85. Vecsei P., Charette R., Hochleithner M. et al., 2004. Guide to the Identification of Sturgeon and Paddlefish Species Controlled under the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Ottawa: CITES. P.30–33.
86. Vignal A., Milan D., San Cristobal M., Eggen A., 2002. A review of SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics // Genet. Sel. Emol. Vol. 34. P.275–305.
87. Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucleic Acids Res. Vol. 23. P.4407–4414.
88. Voynova N. V., Mirzoyan A. V., Timoshkina N. N., Rynza E. T., 2008. Occurrence of non-native specimens of Caspian origin within the Sea of Azov population of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) // J. Appl. Ichth. Vol. 24. P.50–51.
89. Welsh A. B., Blumberg M., May B., 2003. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* // Mol. Ecol. Notes. Vol. 3. P.47–55.
90. Walsh M. G., Bain M. B., Squiers T., Waldman J. R., Wirgin I. 2001. Morphological and genetic variation among Shortnose Sturgeon *Acipenser brevirostrum* from Adjacent and Distant Rivers // Estuaries. Vol. 24. P.41–48.
91. Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G., 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods and applications // 2nd ed. Taylor and Francis Group. 338 p.
92. Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski F. A., Tingey S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers // Methods Enzymol. Vol. 218. P.704–740.
93. Wright J. M., 1993. DNA fingerprinting in fishes // Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Vol. 2. / In Hochachka P.W. and Mommsen T. eds. Amsterdam: Elsevier. P.58–91.
94. Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al., 2002. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // Mol. Ecol. Not. Vol. 2. P.586–588.
95. Zhivotovskiy L. A., 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers // Molecular Ecology. Vol. 8. P.907–913.
96. Zhivotovskiy L. A., M. W. Feldman, 1995. Microsatellite variability and genetic distances // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 92. P.11549–11552.

#### MOLECULAR-GENETIC MARKERS IN STUDY OF INTRA- AND INTERSPECIFIC POLYMORPHISM OF ACIPENSERIFORMES

N. N. Timoshkina, D. I. Vodolazhski, A. V. Usatov

☼ **SUMMARY:** Uniqueness and high commercial value of relic group of sturgeon fishes stimulated researches of their genetic polymorphism. In the review the basic molekular-genetic markers used for an estimation of genetic variability are considered; their merits and demerits are discussed, examples of their application, basically, on *Acipenseriformes* Eurasia are resulted. Problems of the genetic analysis polyploid kinds are is short covered

☼ **KEY WORDS:** genetic polymorphism; polyploidy; molecular genetic markers.

#### ☼ Информация об авторах

Тимошкина Наталья Николаевна — научный сотрудник.  
Южный научный центр РАН.  
344006, Ростов-на-Дону, ул. Чехова 41.  
E-mail: n\_timoshkina@mail.ru

Водолажский Дмитрий Игорьевич — ведущий научный сотрудник.  
Южный научный центр РАН.  
344006, Ростов-на-Дону, ул. Чехова 41.  
E-mail: vodolazhski@mmbi.krinc.ru

Усатов Александр Вячеславович — профессор, д. б. н.  
Южный Федеральный университет.  
344006, Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая 105.  
E-mail: usatova@mail.ru

Timoshkina Natalya N. — Southern Scientific Center of Russian Academy of Sciences (SSC RAS), st. Chehova, 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia  
E-mail: n\_timoshkina@mail.ru

Vodolazhsky Dmitry Ig. — Southern Scientific Center of Russian Academy of Sciences (SSC RAS), st. Chehova, 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia  
e-mail: vodolazhki@mmbi.krinc.ru

Usatov Alexandr V. — professor. Southern Federal University, st. B. Sadovay, 105, Rostov-on-Don, 344006 Russia  
e-mail: usatova@mail.ru