

УДК 575.17:597.442

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ОСЕТРОВЫХ (*Acipenseridae*) И ВЫЯВЛЕНИЯ ОСОБЕЙ ГИБРИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2013 г. А. Е. Барминцева, Н. С. Мюге

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Москва 107140

e-mail: bae69@mail.ru, tugiue@mail.ru

Поступила в редакцию 27.02.2013 г.

Представлены результаты исследования генетического полиморфизма десяти видов осетровых, обитающих на территории Российской Федерации (русский, сибирский, амурский, сахалинский, персидский осетры, шип, стерлядь, севрюга, белуга и калуга), по пяти (*Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161*, *AoxD165*) микросателлитным локусам (всего 3821 особь). Исследованные локусы амплифицируются у всех тестируемых видов с одних и тех же пар праймеров и показывают высокий уровень изменчивости. Выявлены аллели, характерные для разных видов, что позволяет использовать их для видовой идентификации осетровых и продукции из них, а также показана возможность определения особей гибридного происхождения. Анализ принадлежности (*assignment test*), проведенный в программе STRUCTURE, показал высокую вероятность корректного отнесения каждой особи к своему виду по пяти исследованным локусам (в среднем 96–98%), однако для русского и персидского осетра этот показатель значительно ниже (75 и 84% соответственно).

DOI: 10.7868/S0016675813090038

Осетровые – реликтовая группа рыб с длительной эволюционной историей. В настоящее время 10 видов осетровых, обитающих на территории России, находятся на грани исчезновения и внесены в список CITES (Приложение I и II) – конвенции, регламентирующей международную торговлю редкими видами фауны и флоры [1–3].

Установление легальности происхождения продукции из осетровых, искусственное воспроизводство естественных популяций этих рыб, разведение в аквакультуре невозможно без точной идентификации вида на всех стадиях развития особей – от икры до взрослого организма, а также продукции (мясо, балык, пищевая икра и т.п.).

Осетровые выделяются среди других рыб по исключительно широко распространенной скрещиваемости различных видов и большой морфометрической пластичности [4], что затрудняет, а во многих случаях исключает идентификацию по принятым в ихтиологии морфологическим критериям. Также невозможно идентифицировать продукцию из осетровых без применения молекулярно-генетических методов анализа ядерной и митохондриальной ДНК (мтДНК).

Ранее описанная нами тест-система определения восьми видов осетровых, обитающих в России, основанная на использовании видоспецифичных митохондриальных маркеров [5], успешно используется для различных идентификационных

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

Несмотря на высокую экологическую адаптивность, скорость молекулярной эволюции ядерной ДНК у осетровых крайне низкая [6], что позволяет использовать одни и те же микросателлитные праймеры для изучения различных видов отряда *Acipenseriformes* [7, 8].

На сегодняшний день не существует метода ДНК-идентификации гибридов осетровых видов рыб. В России в аквакультуре широкое распро-

странение получили две формы гибридов: бестер (белуга × стерлядь) и “ролик” (русский осетр × сибирский осетр). А использование для искусственного воспроизводства и закладки РМС в аквакультуре диких и доместичированных производителей допускает возможность встречи практически с любой гибридной формой осетровых, описанных Л.С. Бергом еще в 1911 г. [9–11].

Одним из основных методов исследования ядерной ДНК является изучение аллельного состава микросателлитных локусов (STR-анализ). Именно эти регионы ДНК, не находящиеся под давлением отбора, эволюционируя со своей собственной скоростью, постепенно накапливают наследуемые в потомстве дифференциальные признаки, анализ которых позволяет проводить межвидовую, внутривидовую (популяционную) и индивидуальную идентификацию особей осетровых видов рыб.

Особенностью генетического анализа осетровых видов рыб является разная ploidy различных видов. Полиплоидные многохромосомные виды (240 хромосом), такие как русский осетр *A. gueldenstaedtii*, сибирский осетр *A. baerii*, персидский осетр *A. persicus*, амурский *A. schrenskii* и сахалинский *A. micadoi* осетры, имеют тетрасомный характер наследования [12]. Позже к полиплоидным многохромосомным видам была отнесена калуга *H. dauricus*, ранее считавшаяся малохромосомным видом, а также сахалинский осетр [13, 14], у которого предполагался 16-плоидный геном на основании данных по количеству ДНК в ядре эритроцита [15].

Группа малохромосомных осетров насчитывает около 120 хромосом и имеет дисомный характер наследования. К ней из российских видов относятся понтокаспийские виды белуга *H. huso*, стерлядь *A. ruthenus*, севрюга *A. stellatus* и шип *A. nudiventris*.

Полиплоидность генома осетровых рыб затрудняет статистический анализ генетических данных, так как большинство используемых компьютерных программ (GenAlEx6 [16], надстройка Microsatellite Toolkit [17], Arlequin 3.1 [18] и многие другие) основываются на диплоидном характере наследования.

Известно несколько способов ДНК-идентификации видовой принадлежности осетровых и продукции из них с использованием как митохондриальных [5, 19–22], так и ядерных [2, 23–25] маркеров. Например, было показано, что аллель 111 (пн) в локусе *LS-39* присутствует только у севрюги и отсутствует в 10 других видах осетровых [24], и использование этого локуса возможно при идентификации севрюги. К сожалению, применение локуса *LS-39* ограничено, поскольку этот локус не амплифицируется у таких коммерчески используемых видов, как русский и сибирский

осетр. В другой работе [25] представлена попытка идентификации стерляди, белуги, русского и сибирского осетров, а также гибридов аквакультурного происхождения путем анализа диагностических аллелей по пяти микросателлитным локусам, однако ограниченность выборки (от семи экземпляров) и низкие частоты аллелей, рассматриваемых авторами как “диагностические” (от 1%), а также по ряду локусов несоответствие аллельного состава гибридов родительским видам не позволяют использовать эти данные для корректной идентификации.

В нашей работе мы попытались обобщить накопленный материал за 8-летний период исследования микросателлитных локусов осетровых видов рыб и выявить видоспецифичные аллели, которые позволяют идентифицировать видовую принадлежность образца, а также, с учетом анализа мтДНК, происхождение гибридной особи как по материнской, так и по отцовской линии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для генотипирования производителей осетровых использовали набор из пяти микросателлитных локусов (*Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161*, *AoxD165*), ранее опубликованных для других видов осетровых [26–28]. Данные пять локусов были отобраны по результатам предварительного тестирования большого числа (более 20) локусов по принципу высокой воспроизводимости амплификации, наибольшего полиморфизма, соответствия равновесию Харди–Вайнберга и по отсутствию нуль-аллелей у большинства видов, обитающих в России.

Анализ аллельного полиморфизма микросателлитных локусов был произведен на образцах, собранных в 2002–2012 гг. и хранящихся в Российской Национальной Коллекции Эталонных Генетических Материалов (РНКЭГМ) ВНИРО (Свидетельство об официальной регистрации базы данных № 2006620351). Размеры выборок колеблются от 56 особей (для редких видов, таких как сахалинский осетр) до 1225 особей (для русского осетра). Всего было проанализировано 3821 особь различных видов осетровых рыб (табл. 1).

Пробы осетровых рыб отбирались прижизненным методом путем отрезания фрагмента спинного или грудного плавника, образцы были зафиксированы в 96%-ном этиловом спирте на местах сбора материала. Каждому образцу присваивался идентификационный номер. Все взятые образцы были занесены в РНКЭГМ. Выделение и последующую очистку ДНК из плавников осетровых рыб проводили методом абсорбции на колонках (PALL) [29] или солевым методом [30] с небольшими модификациями, с контролем качества выде-

Таблица 1. Характеристика исследованного материала

Вид	Происхождение	Популяция	Количество образцов
Русский осетр <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Каспий	естественная	810
		искусственная	7
	Азов	естественная	30
		искусственная	290
	Черное море	естественная	88
	Всего:		1225
Осетр сибирский <i>Acipenser baerii</i>	р. Лена	естественная	22
		искусственная	594
	р. Обь, Иртыш	естественная	14
		искусственная	91
	оз. Байкал	естественная	16
		искусственная	8
	р. Енисей	естественная	6
	Всего:		751
Персидский осетр <i>Acipenser persicus</i>	Каспий	естественная	230
Амурский осетр <i>Acipenser schrenckii</i>	р. Амур	искусственная	58
Осетр сахалинский <i>Acipenser mikadoi</i>	о. Сахалин, р. Тумнин	естественная	19
		искусственная	37
	Всего:		56
Калуга <i>Huso dauricus</i>	р. Амур	естественная	48
	р. Амур	искусственная	63
	Всего:		111
Белуга <i>Huso huso</i>	Каспий	естественная	95
		искусственная	14
	Азов	естественная	61
		искусственная	94
	Черное море	естественная	28
	Всего:		292
Стерлядь <i>Acipenser ruthenus</i>	р. Дон, Волга, Кубань	искусственная	420
	р. Енисей	естественная	46
	Всего:		466
Шип <i>Acipenser nudiiventris</i>	р. Урал	естественная	37
	Арал	естественная	1
		искусственная	45
Всего:		83	
Севрюга <i>Acipenser stellatus</i>	Каспий	естественная	314
		искусственная	106
	Азов	естественная	33
		искусственная	73
	Черное море	естественная	23
Всего:		549	
Всего образцов:			3821

Таблица 2. Микросателлитные локусы для анализа полиморфизма осетровых видов рыб

Локус	Праймеры 5'-3'	Метка
<i>An20</i> ^[26]	F: AATAACAATCATTACATGAGGCT	HEX
	R: TGGTCAGTTGTTTTTTTATTGAT	
<i>Afug41</i> ^[27]	F: TGACGCACAGTAGTATTATTTATG	FAM
	R: TGATGTTTGCTGAGGCTTTTC	
<i>Afug51</i> ^[27]	F: ATAATAATGAGCGTGCTTTCTGTT	HEX
	R: ATTCCGCTTGCGACTTATTTA	
<i>AoxD165</i> ^[28]	F: TTTGACAGCTCCTAAGTGATACC	TAMRA
	R: AAAGCCCTACAACAAATGTCAC	
<i>AoxD161</i> ^[28]	F: GTTTGAAATGATTGAGAAAATGC	FAM
	R: TGAGACAGACACTCTAGTTAAACAGC	

ления на спектрофотометре SPECTRAmax PLUS 384. ДНК хранили при -20°C до использования.

Образцы были проанализированы по пяти микросателлитным локусам [26–28] (табл. 2).

Реакции амплификации проводили в конечном объеме 15 мкл [70 mM Трис-НСI (pH 8.6); 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1.8 mM MgCl_2 ; по 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата; 1 пкМ праймера, модифицированного на 5'-конце флуоресцентным красителем FAM, HEX или TAMRA; 4 пкМ обратного (не меченного) праймера; 50–100 нг ДНК-матрицы и 0.8 единиц *Taq*-полимеразы (“Силекс”)] по следующей схеме: предварительная денатурация ДНК 94°C – 1 мин; 8 циклов: плавление – 95°C – 20 с, отжиг праймеров – 58°C в первом цикле – 25 с и в каждом последующем цикле температура отжига снижалась на 0.5°C , синтез ДНК – 65°C – 40 с; 25 циклов: плавление – 95°C – 20 с, отжиг праймеров – 54°C , синтез ДНК – 65°C – 40 с; досинтез ДНК при 65°C – 10 мин.

Полученную ПЦР смесь разбавляли в 3 раза milliQ, затем по 1 мкл разбавленной реакции переносили в 12 мкл формамида Hi-Di с добавленным молекулярным стандартом для определения размера амплифицируемых фрагментов ДНК.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили с помощью системы капиллярного электрофореза “ABI3100/3130 Genetic analyzer”, определение длин аллелей осуществляли с применением программного обеспечения GeneMarker (Version 1.2). Определение вероятности принадлежности особей к каждой из предполагаемых популяций (видов) проводилось в программе Structure 2.3.3 [31].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация видоспецифичных аллелей

Все исследованные локусы оказались полиморфными у всех изучаемых видов (количество аллелей на локус варьирует от 2 до 29 в зависимости от вида и локуса, табл. 3). Исключение составляет локус *Afug41* для калуги – амплификация по данному локусу не идет. Максимальное количество аллелей на особь у многохромосомных видов для всех локусов составляло четыре аллеля, у малохромосомных – два. Размерный состав и частоты встречаемости аллелей по видам для локусов *An20* и *AoxD161* представлены в табл. 4, для *Afug51* и *AoxD165* – в табл. 5 и локуса *Afug41* – в табл. 6. В таблицах отражены аллели, имеющие частоту встречаемости более 1%.

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

Для сахалинского осетра (MED) по локусу *Afug41* специфичным является аллель 197 (здесь и далее обозначение аллеля приводится по длине амплифицированного фрагмента, выраженной в парах нуклеотидов), а по локусу *Afug51* – аллель 296. Частота более 90% означает, что хотя бы одна копия этого аллеля в тетраплоидном сахалинском осетре присутствует практически у всех (99.995%) особей. По локусу *AoxD161* аллель 114 также встречается практически у всех проанализированных особей. По локусу *AoxD165* аллели в диапазоне 254–230, а по локусу *An20* аллели 197–185 характерны только для этого вида.

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

Стерлядь (RUT) определяется по аллелю 177 локуса *An20* (аллель присутствует у более 80% особей и незначительно встречается у других ви-

Таблица 3. Характеристика микросателлитных локусов для различных видов осетровых рыб*

Вид	<i>Afig41</i>				<i>An20</i>				<i>AoxDI61</i>				<i>Afig51</i>				<i>AoxDI65</i>				
	Число аллелей на локус	Диапазон (размер), пн	Ср. кол-во аллелей на особь	Ожидаемая гетерозиготность	Число аллелей на локус	Диапазон (размер), пн	Ср. кол-во аллелей на особь	Ожидаемая гетерозиготность	Число аллелей на локус	Диапазон (размер), пн	Ср. кол-во аллелей на особь	Ожидаемая гетерозиготность	Число аллелей на локус	Диапазон (размер), пн	Ср. кол-во аллелей на особь	Ожидаемая гетерозиготность	Число аллелей на локус	Диапазон (размер), пн	Ср. кол-во аллелей на особь	Ожидаемая гетерозиготность	Ср. гетерозиготность по всем локусам
GUE	24	265–173	3.4	0.99	17	193–129	2.8	0.98	15	146–86	3.1	0.99	26	296–204	2.6	0.99	29	212–140	2.9	0.97	0.98
BAE	16	249–181	3.2	0.99	12	189–145	2.8	0.98	10	146–102	3.3	0.99	20	312–232	2.3	0.98	23	212–168	2.7	0.96	0.98
PER	21	261–173	3.2	0.99	13	185–137	2.5	0.96	12	154–102	3.2	0.99	17	288–212	2.6	0.98	19	206–150	2.6	0.92	0.97
SCH	9	225–185	3.1	0.99	8	173–133	1.6	0.59	10	142–106	3.1	0.99	8	296–208	2.6	0.87	12	216–164	3.2	0.99	0.89
MED	8	225–185	2.4	0.99	7	197–161	2.2	0.98	4	126–114	2.1	0.87	2	296–288	1.3	0.25	15	254–182	3	0.98	0.81
DAU	–	–	–	–	3	169–149	2.2	0.93	9	146–114	3.1	0.98	5	252–228	2.0	0.76	12	218–174	3.1	0.99	0.92
HUS	20	285–201	1.8	0.87	12	181–137	1.6	0.58	6	122–98	1.2	0.33	8	296–244	1.5	0.62	10	200–170	1.4	0.34	0.55
RUT	16	257–197	1.8	0.89	11	181–141	1.7	0.76	10	138–102	1.8	0.83	9	276–236	1.4	0.46	17	204–164	1.8	0.84	0.76
NUD	10	253–201	1.8	0.76	4	165–149	1.5	0.56	8	142–114	1.9	0.82	4	272–256	1.6	0.66	8	216–168	1.8	0.74	0.71
STE	15	241–177	1.9	0.88	14	189–129	1.5	0.55	10	142–106	1.8	0.8	12	296–252	1.5	0.57	26	214–148	1.8	0.94	0.75

* Расшифровка трехбуквенных символов осетровых видов рыб приведена в тексте.

Таблица 4. Частота встречаемости аллелей локусов *An20* и *AoxD161* у разных видов осетровых рыб

Вид	<i>An20</i>													<i>AoxD161</i>																
	197	193	189	185	181	177	173	169	165	161	157	153	149	145	141	137	129	146	142	138	134	130	126	122	118	114	110	106	102	98
BAE				0.01			0.04	0.23	0.15	0.31	0.15	0.03	0.05				0.02			0.14	0.12	0.13	0.22	0.01	0.01	0.26	0.02	0.08		
DAU								0.50	0.30			0.20					0.04	0.04	0.11	0.14	0.18	0.18	0.39	0.14						
HUS						0.02	0.04		0.02	0.04	0.02	0.59	0.26						0.05	0.13	0.22	0.21	0.14	0.11	0.03	0.03	0.01	0.12	0.87	
NUD										0.21	0.61	0.01												0.06	0.60					
RUT					0.02	0.42	0.02	0.12	0.08	0.18	0.06	0.02							0.08	0.08	0.04	0.04	0.12	0.05	0.04	0.12	0.14	0.33		
GUE					0.01	0.06	0.33	0.09	0.32	0.07	0.04	0.01	0.03			0.01														
MED	0.06	0.27	0.03	0.12	0.19			0.01		0.31												0.01	0.03							
PER					0.05	0.07	0.43	0.05	0.29	0.09												0.05	0.05	0.29	0.05	0.04	0.05	0.04	0.06	
SCH							0.03	0.01		0.06	0.04	0.04				0.80					0.03	0.01			0.04	0.04				
STE					0.04	0.02				0.01			0.24	0.62	0.02	0.05						0.03								

Примечание. Жирным шрифтом (для табл. 4–6) выделены частоты аллелей, позволяющие проводить видовую идентификацию и обсуждаемые в тексте.

Таблица 5. Частота встречаемости аллелей локусов *Afug51* и *AoxD165* у разных видов осетровых рыб

Вид	<i>Afug51</i>																					
	300	296	292	288	284	280	276	272	268	264	260	256	252	248	244	240	236	232	228	224	212	208
BAE	0.04	0.02	0.04		0.34	0.02	0.06	0.05	0.02	0.03	0.25	0.07	0.03					0.01				
DAU													0.25			0.10	0.25	0.30	0.1			
HUS									0.35	0.49	0.14				0.02							
NUD								0.43	0.27	0.30	0.01											
RUT									0.04	0.01	0.01	0.71	0.19	0.04								
GUE			0.01		0.04		0.08	0.02	0.04	0.04	0.08	0.04	0.04	0.02	0.10	0.10	0.14	0.31		0.04		0.01
MED		0.93		0.07																		
PER								0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01			0.15	0.16	0.35		0.25	0.01	
SCH		0.05						0.04	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08				0.60	0.04				0.01
STE			0.11	0.63	0.09	0.10	0.01	0.01	0.01		0.03											

AoxD165

254	242	238	234	230	216	212	210	208	206	204	202	200	198	196	194	192	190	188	186	184	182	180	178	176	174	172	170	168	164	156	152	148		
BAE								0.02		0.04	0.07		0.20			0.04		0.08	0.04		0.42	0.04*												
DAU				0.02		0.28					0.06	0.15			0.03	0.04	0.17						0.79		0.13									
HUS																			0.18						0.01									
NUD					0.03					0.03	0.26		0.40						0.14	0.05							0.11							
RUT													0.03	0.03	0.03	0.03	0.07	0.01	0.21	0.02	0.28			0.16	0.07		0.07	0.01						
GUE											0.02		0.03	0.03	0.06	0.01	0.05	0.03	0.09	0.03	0.06		0.41	0.03	0.10									
MED	0.06	0.01	0.13	0.39	0.05		0.11					0.05					0.02	0.02	0.11		0.01													
PER										0.04		0.10	0.04	0.04	0.04	0.10	0.01	0.08	0.01	0.09	0.01	0.54	0.02	0.05					0.03					
SCH										0.04	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.07	0.17	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.17	0.15				0.15						
STE								0.01		0.01	0.07	0.02	0.03	0.01	0.05	0.04	0.04	0.11	0.10	0.09	0.11	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.07	0.07	0.03	0.03	

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

Таблица 6. Частота встречаемости аллелей локуса *Afug41* у разных видов осетровых рыб

Вид	277	269	265	261	257	253	249	245	241	237	233	229	225	221	217	213	209	205	201	197	193	189	185	173
BAE							0.01	0.05	0.04	0.02	0.07	0.04	0.24	0.04	0.15	0.03	0.12	0.02		0.17				
DAU																								
HUS	0.02	0.02	0.05	0.01	0.05	0.06	0.07	0.22	0.08	0.19	0.14	0.04	0.03											
NUD						0.02	0.04	0.35	0.07	0.30	0.02	0.08				0.01			0.10					
RUT						0.01	0.01	0.04	0.11	0.11	0.08	0.19	0.14	0.10	0.09	0.04	0.03	0.04	0.01	0.05				
GUE							0.01	0.02	0.03	0.05	0.04	0.06	0.06	0.05	0.06	0.09	0.12	0.08	0.11	0.15	0.03			0.02
MED													0.06		0.04	0.01		0.07	0.19	0.57	0.03			
PER									0.01	0.03	0.01	0.01		0.04	0.04	0.11	0.11	0.08	0.20	0.28	0.01			0.03
SCH																0.03	0.04	0.02	0.03	0.23	0.18	0.20	0.27	
STE											0.06	0.05	0.07	0.09	0.07	0.17	0.10	0.14	0.05	0.19	0.03			

дов – менее 7%); по локусу *Afug 51* – определяющий аллель 252, который встречается и у калуги, но эти виды легко отличаются по разной плоидности; так же как и сибирский осетр, несущий аллель 180 по локусу *AoxD165*, который присутствует и у половины особей стерляди.

Для калуги (DAU) отсутствие амплификации по локусу *Afug41* может служить четким видоспецифичным маркером на данный вид осетровых рыб, а также только у этого вида встречается аллель 206 по локусу *AoxD165*, а аллель 169 локуса *An20* встречается у 93% особей (частота аллеля – около 50%).

Для белуги (HUS) по локусу *An20* – определяющие аллели 149 и 145, причем аллель 149 характерен в меньшей степени и калуге (которой присуща более высокая плоидность), и здесь для точной идентификации необходимо использование нескольких локусов, имеющих специфичные для белуги аллели, например локус *AoxD161*. По этому локусу практически все особи (98%) несут аллель 98, который не характерен для других видов (у русского и персидского осетров – менее 1%). В российских аквакультурных хозяйствах под видом шипа часто встречается гибрид белуги на шипа, который легко определяется именно по этому аллелю и имеет митохондриальный гаплотип белуги. По локусу *AoxD165* 96% особей белуги несут аллель 178, этот аллель в подавляющем количестве несут и тетраплоидные, в отличие от белуги, русский и персидский осетры. В конце диапазона локуса *Afug41* располагаются аллели, характерные только для белуги, хотя частота встречаемости этих аллелей невелика (249–277).

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

Для амурского осетра (SCH) характерен аллель 137 локуса *An20*, причем этот аллель встречается у 100% особей. В начале размерного диапазона ло-

куса *Afug41* несколько аллелей встречаются преимущественно в амурском осетре (аллели 197, 193, 189, 185) и 99% особей будут нести хотя бы один из этих аллелей, которые могут служить генетическим маркером вида.

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

Аллели по всем локусам, информативные при видовой идентификации особей, представлены в табл. 7.

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

Для оценки применимости анализируемых микросателлитных локусов нами был проведен анализ принадлежности к группировке (assignment test), реализованный в программе Structure [31] с использованием параметра *K* в соответ-

ствии с числом анализируемых видов ($K = 4$ для малохромосомных видов, и $K = 6$ для многохромосомных видов) Поскольку все исследованные нами в данной работе микросателлитные локусы у малохромосомных видов имели диплоидный характер наследования, а многохромосомные – тетраплоидный, в программе Structure параметр ploidy был указан как diploid и tetraploid соответственно. В связи с разным параметром ploidy сравнение диплоидной (рис. 1) и тетраплоидной (рис. 2) групп осетровых проводилось отдельно. Ожидаемая гетерозиготность (H_e) по всем пяти локусам приведена в табл. 3 и ее значения достаточно высоки, особенно для многохромосомных видов, и только у белуги как наиболее мноморфного вида H_e значительно меньше – 0.55. Проведенный “assignment test” показал, что каждому виду соответствует свой отдельный кластер, и только кластеры русского и персидского осетров пересекаются друг с другом. Вероятность принадлежности отдельных особей к виду для амурского, сахалинского, сибирского осетров и калуги достаточно высока, не ниже 93% (табл. 8), а вот для персидского и русского осетров вероятность составляет 84% и 75% соответственно. Максимальная принадлежность для большинства особей составляет 99%, а минимальная, например для сибирского осетра, около 35%, но таких только две особи и на 65% они приписываются к кластеру русского осетра.

Особи русского и персидского осетров имеют минимальную принадлежность меньше 1%. Такие особи ложатся в кластеры друг друга.

Вероятность принадлежности отдельных особей к виду в малохромосомной выборке в среднем составляет чуть больше 98% (для шипа) или чуть меньше для всех остальных. Максимальная вероятность для всех видов составляет 0.99, и большинство особей имеют вероятность принадлежности к своему кластеру 0.99–0.96. Однако минимальные значения единичных особей значительно ниже – шип (0.87), севрюга (0.70), стерлядь (0.55), белуга

Таблица 7. Видоспецифичные аллели исследованных STR-локусов осетровых видов рыб, пригодные для видовой идентификации, а также установления происхождения гибридных особей по отцовской линии

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

(0.36). Причем особь стерляди с низкой вероятностью принадлежности к своему кластеру приписывается к кластеру шипа, а особи белуги – к севрюжью кластеру.

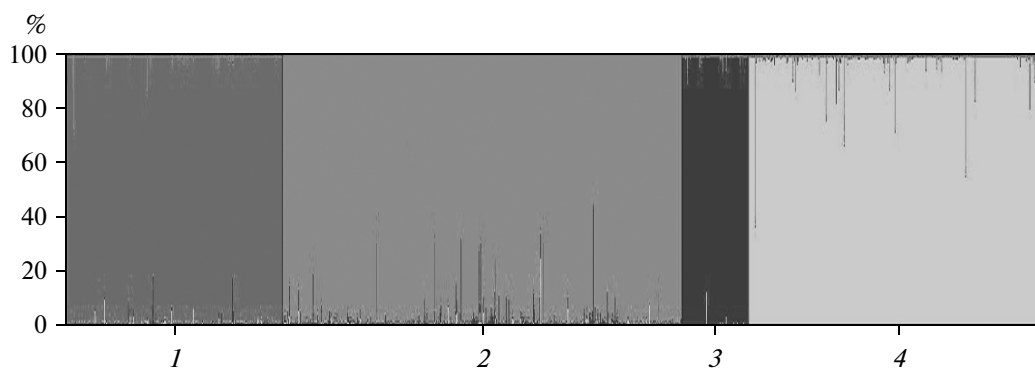


Рис. 1. Выделение отдельных видов 2n-осетровых в кластеры (Structure, diploid, $K = 4$). 1 – севрюга, 2 – стерлядь, 3 – шип, 4 – белуга.

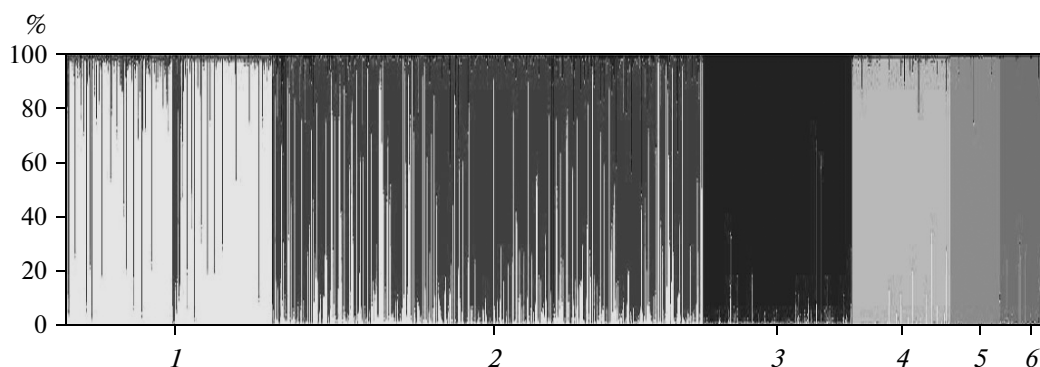


Рис. 2. Выделение отдельных видов 4n-осетровых в кластеры (Structure, tetraploid, $K = 6$). 1 – персидский осетр, 2 – русский осетр, 3 – сибирский осетр, 4 – калуга, 5 – сахалинский осетр, 6 – амурский осетр.

Идентификация особей гибридного происхождения

Выявленные нами различия в частотах аллелей у разных видов позволяют также проводить идентификацию особей гибридного происхождения. По многочисленным опубликованным данным в природе встречаются гибридные особи практически всех симпатрически обитающих видов осетровых, в том числе и видов с разной ploidy [9–11].

При определении происхождения продукции из осетровых среди образцов, декларированных как калуга (при проведении генотипирования по вышеуказанным локусам), один был идентифицирован как гибрид калуги на амурского осетра (образец № 1, табл. 9).

Проведенный анализ по мтДНК у всех образцов подтвердил материнское происхождение калуги. При проведении STR-анализа для образца № 1 были выявлены неспецифичные аллели для калуги, но характерные для амурского осетра (табл. 9). Данные приведены только для наиболее информативных локусов исследуемого образца.

По предложенным ядерным маркерам была идентифицирована как гибрид русского осетра на белугу особь (образец № 2), выловленная в Черном море (Лазаревское) в 2009 г. для целей воспроизводства [32]. Данный образец по мтДНК определен как русский осетр, в каждом локусе ам-

плифицировалось не более трех аллелей, так как это гибрид между много- и малохромосомным видами, один из которых характерен для белуги, а два – для русского осетра.

Образцы 3 и 4 были предоставлены ОРЗ для генетической идентификации и декларированы как шип. При генотипировании была установлена мтДНК, характерная для белуги, а микросателлитный анализ выявил аллели, специфичные для белуги, стерляди и шипа. На основании полученных данных сделано заключение, что представленные образцы являются гибридными особями бестера и шипа (тройной гибрид).

Образец 5 был предоставлен казахским ОРЗ и декларирован как гибрид русского осетра и севрюги. Проведенный анализ подтвердил гибридное происхождение особи. Исследование мтДНК обнаружило наличие “baerii-like” гаплотипа русского осетра, характерного для каспийской популяции этого вида [5, 21, 33]. Микросателлитный анализ показал триплоидный характер наследования и специфичный для севрюги один из трех амплифицированных аллелей в каждом локусе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проводящийся в нашей лаборатории в течение последних восьми лет анализ полиморфизма по

Таблица 8. Пропорциональный состав исследованных выборок в сгенерированных кластерах. Число кластеров соответствует числу выборок

Вид	PER	GUE	BAE	DAU	MED	SCH
PER	0.835	0.134	0.006	0.014	0.005	0.007
GUE	0.182	0.751	0.033	0.018	0.004	0.011
BAE	0.006	0.02	0.959	0.007	0.004	0.004
DAU	0.018	0.008	0.008	0.960	0.003	0.004
MED	0.002	0.002	0.003	0.003	0.981	0.008
SCH	0.007	0.01	0.016	0.005	0.032	0.931

Таблица 9. Идентификационные аллели для исследованных образцов гибридов различного происхождения

№ п/п	Образец	мтДНК	<i>An20</i>	<i>Afug51</i>	<i>Afug41</i>	<i>AoxD165</i>	<i>AoxD161</i>	Примечания
1	Калуга × амурский осетр, тетраплоид	Калуга	137		193			Характерен для амурского осетра
			137		197			Характерен для амурского осетра
			149		Нет			Характерен для калуги
			169		Нет			Характерен для калуги
2	Русский осетр × белуга, триплоид	Русский осетр	149				98	Характерен для белуги
			145				122	Характерен для русского осетра
			173				134	Характерен для русского осетра
3	Бестер × шип, диплоид	Белуга	165	272	245		138	Характерен для шипа
			149					Характерен для белуги
				252	229		122	Характерен для стерляди
4	Бестер × шип, диплоид	Белуга	165	272	237	196	118	Характерен для шипа
			149			178	102	Характерен для белуги
				252	229			Характерен для стерляди
5	Русский осетр × севрюга, триплоид	Русский осетр “baerii-like”	141	288		152		Характерен для севрюги
			165	268		182		Характерен для русского осетра
			177	240		186		Характерен для русского осетра

Примечание. Жирным шрифтом выделены аллели, не характерные для установленной мтДНК образца.

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

Использование разработанных ранее тестов, основанных на видоспецифичной ПЦР по контрольному региону митохондриальной ДНК [5], позволяет провести идентификацию при наличии простейшего оборудования – необходимы только ПЦР-амплификатор и прибор для электрофореза в агарозном геле, имеющиеся в большинстве аналитических лабораторий.

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

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

Особое значение своевременное выявление гибридных особей приобретает при анализе ремонтно-маточных стад на осетровых рыбопроизводных заводах (ОРЗ). Катастрофическое снижение численности идущих на нерест диких производителей заставляет практически все ОРЗ использовать для получения молоди половые продукты доместикованных, а иногда и полученных “от икры” аквакультурных рыб. Своевременная выбраковка гибридных особей (как среди выловленных из природы, так и среди аквакультурных) необходима для поддержания генетической целостности природной популяции восстанавливаемых видов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Raymakers C.* CITES, the Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora: its role in the conservation of Acipenseriformes // *J. Appl. Ichthyol.* 2006. V. 22 (Suppl. 1). P. 53–65.

2. Ludwig A. Identification of Acipenseriformes species in trade // J. Appl. Ichthyol. 2008. V. 24. Suppl. 1. P. 2–19.
3. Raymakers C., Hoover C. Acipenseriformes: CITES implementation from Range States to consumer countries // J. Appl. Ichthyol. 2002. V. 18(4–6). P. 629–638.
4. Николюкин Н.И. Отдаленная гибридизация осетровых и костистых рыб (теория и практика). М.: Пищевая пром-сть, 1972. С. 255, 282.
5. Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Расторгуев С.М. и др. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика. 2008. Т. 44. № 7. С. 913–919.
6. Krieger J., Fuerst P.A. Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes // Mol. Biol. Evol. 2002. V. 19(6). P. 891–897.
7. May B., Krueger C.C., Kincaid H.L. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus* // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1997. V. 54. № 7. P. 1542–1547.
8. Congiu L., Pujolar J.M., Foriani A. et al. Managing polyploidy in ex situ conservation genetics: the case of the critically endangered Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // PLoS One. 2011. V. 6. № 3. e18249. P. 1–10.
9. Берг Л.С. Фауна России и сопредельных стран. Т. 1. Рыбы. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1911. 337 с.
10. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран (в 3-х частях). М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1948. Ч. 1. 467 с.
11. Birstein V.J., Hanner R., DeSalle R. Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches // Sturgeon Biodiversity and Conservation. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1997. P. 127–155.
12. Ludwig A., Belfiore N.M., Pitra C. et al. Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) // Genetics. 2001. V. 158. P. 1203–1215.
13. Васильев В.П., Васильева Е.Д., Шедько С.В., Новомодный Г.В. Уровень плоидности калуги *Huso dauricus* и сахалинского осетра *Acipenser mikadoi* (Acipenseridae, Pisces) // ДАН. 2009. Т. 426. № 2. С. 420–433.
14. Вишнякова Х.С., Мюге Н.С., Зеленина Д.А. и др. Культура клеток и кариотип сахалинского осетра *Acipenser mikadoi* // Биол. мембраны. 2008. Т. 25. № 6. С. 420–433.
15. Birstein V.J., Poletaev A.I., Goncharov B.F. DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry // Cytometry. 1993. V. 14. № 4. P. 377–383.
16. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecology Notes. 2006. V. 6. P. 288–295.
17. Park S.D.E. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection // Ph.D. Thesis Univ. Dublin, 2001.
18. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis // Evol. Bioinformatics Online. 2005. V. 1. P. 47–50.
19. DeSalle R., Birstein V.J. PCR identification of black caviar // Nature. 1996. V. 381. P. 197–198.
20. Birstein V.J., Doukakis P., Sorkin B., Desalle R. Population aggregation analysis of three caviar-producing species of sturgeons and implications for the species identification of black caviar // Conserv. Biology. 1998. V. 12(4). P. 766–775.
21. Birstein V.J., Doukakis P., DeSalle R. Polyphyly of mtDNA lineages in the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*: Forensic and evolutionary implications // Conserv. Genetics. 2000. V. 1(1). P. 81–88.
22. Ludwig A., Debus L., Jenneckens I. A molecular approach to control the international trade in black caviar // Intern. Review Hydrobiology. 2002. V. 87(5–6). P. 661–674.
23. Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Усатов А.В. Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (*Acipenseriformes*) // Экологическая генетика. 2010. Т. VIII. № 1. С. 12–24.
24. Jenneckens J.-N., Meyer G., Horstgen-Schwark B. et al. A fixed allele at microsatellite locus *LS-39* exhibiting species-specificity for the black caviar producer *Acipenser stellatus* // J. Appl. Ichthyol. 2001. V. 17. P. 39–42.
25. Fopp-Bayat D., Luczynski M. Microsatellite DNA polymorphism in sturgeon species and their hybrids reared in Polish aquaculture farms // Environmental Biotechnology. 2006. V. 2. № 1. P. 11–19.
26. Zane L., Patarnello T., Ludwig A. et al. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) // Mol. Ecology Notes. 2002. V. 2. P. 586–588.
27. Welsh A.B., Blumberg M., May B. Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris* // Mol. Ecology Notes. 2003. V. 3. P. 47–55.
28. Henderson-Arzapalo A., King T.L. Novel microsatellite markers for Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) population delineation and broodstock management // Mol. Ecology Notes. 2002. V. 2. P. 437–439.
29. Ivanova N.V., deWaard J., Hebert P.D.N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Mol. Ecology Notes. 2006. V. 6. P. 998–1002.
30. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Oxford J. Life Sciences: Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
31. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. P. 945–959.
32. Nebesikhina N.A., Barmintseva A.E., Timoshkina N.N. The discovery triploid hybrid Russian sturgeon and beluga (*Acipenser gueldenstaedtii* × *Huso huso*) in the Western Black Sea // Molecular Phylogenetics: Contributions to the 3rd Moscow Intern. Conf. “Mol. Phyl. 1” (Moscow, Russia, July 31–August). М., 2012. P. 2–1. С. 9.
33. Jenneckens I., Meyer J.-N., Debus L. et al. Evidence of mitochondrial DNA clones of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, caught in the River Volga // Ecology Letters. 2000. V. 3(6). P. 503–508.

The Use of Microsatellite Loci for Identification of Sturgeon Species (Acipenseridae) and Hybrid Forms

A. E. Barmintseva and N. S. Mугue

*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), Moscow, 107140 Russia
e-mail: bae69@mail.ru; mугue@mail.ru*

The genetic polymorphism of ten sturgeon species that inhabit the territory of the Russian Federation (Russian sturgeon, Siberian sturgeon, Amur sturgeon, Sakhalin sturgeon, Persian sturgeon, ship sturgeon, starlet, stellate sturgeon, beluga, and kaluga) was examined at five microsatellite loci (*Afug41*, *Afug51*, *An20*, *AoxD161*, *AoxD165*) (in total, 3821 individuals). The examined loci were successfully amplified with the same primer set in all species tested and demonstrated a high level of variation. Alleles specific to different species have been identified, which allows them to be used to identify species of sturgeon and their food products. In addition, the possibility of identifying hybrid forms was demonstrated. The assignment test performed in the STRUCTURE software program showed a high probability of correctly assigning each individual to its species based on genotyping with five microsatellite loci examined (96–98%, on average). However, for Russian and Persian sturgeon, the rate of proper species assignment was considerably lower (75 and 84%, respectively).