

**ГЕНЕТИКА**

УДК 539.2/.3:502.743:575.174.015.3

DOI: 10.17072/1994-9952-2021-1-53-60.

**Л. В. Комарова<sup>a</sup>, А. Р. Пелеева<sup>c</sup>, Н. В. Костицына<sup>a</sup>, А. Г. Мельникова<sup>b</sup>,  
С. В. Боронникова<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

<sup>b</sup> Пермский филиал ФГБНУ «ВНИРО», Пермь, Россия

<sup>c</sup> Исследовательский Центр «ФитоИнженерия», с. Рогачево Московской обл., Россия

**ПОЛИМОРФИЗМ ДНК, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОРИГИНАЛЬНОСТЬ  
И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ И РЕМОНТНО-  
МАТОЧНЫХ СТАД СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER RUTHENUS*)**

Изучен полиморфизм ДНК, определены показатели генетического разнообразия и генетической оригинальности трех естественных популяций и трех ремонтно-маточных стад стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, *Acipenseridae*) из Приволжского федерального округа. В группе ремонтно-маточных стад *A. ruthenus* выявлено 106 ISSR-PCR маркеров, а в группе естественных популяций – 103 ISSR-PCR маркера. Показатели генетического разнообразия и коэффициент генетической оригинальности (КГО) оказались незначительно выше в группе естественных популяций. Анализ генетической структуры группы естественных популяций и группы ремонтно-маточных стад *A. ruthenus* показал, что коэффициент генетической подразделенности также незначительно выше в группе естественных популяций, и равен 0,377. В результате молекулярно-генетической идентификации выявлены родовые и видовые идентификационные фрагменты ДНК стерляди, а также сочетания полиморфных фрагментов для идентификации изученных естественных популяций и стад. Полученные данные могут быть использованы для сохранения генофонда популяций стерляди, который характерен для того или иного региона.

**Ключевые слова:** полиморфизм ДНК; оригинальность; идентификация; популяции; ремонтно-маточные стада; *Acipenser ruthenus*.

**L. V. Komarova<sup>a</sup>, A. R. Peleeva<sup>c</sup>, N. V. Kostitsyna<sup>a</sup>, A. G. Melnikova<sup>b</sup>,  
S. V. Boronnikova<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Perm State University, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm branch of FGBNU «VNIRO», Perm, Russian Federation

<sup>c</sup> PhytoEngineering Research Center LLC, s. Rogachevo Moscow region, Russian Federation

**DNA polymorphism, genetic originality and identification of sterlet  
populations and replacement broodstock (*Acipenser ruthenus*)**

DNA polymorphism has been studied, indicators of genetic diversity and genetic originality have been determined for three natural populations and three replacement broodstocks of sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, *Acipenseridae*) from the Volga Federal District. In the group of *A. ruthenus* replacement broodstock, 106 ISSR-PCR markers were identified, and in the group of natural populations, 103 ISSR-PCR markers. The indicators of genetic diversity and the coefficient of genetic originality (CGO) were slightly higher in the group of natural populations. Analysis of genetic structure of natural populations and groups of broodstock herds *A. ruthenus* showed that the coefficient of genetic differentiation are also slightly higher in the group of natural populations and equal 0,377. As a result of molecular genetic identification, generic and species identification fragments of sterlet DNA were revealed, as well as combinations of polymorphic fragments for identification of the studied natural populations and stocks. The data obtained can be used to preserve the gene pool of populations, which is characteristic for a particular region.

**Key words:** DNA polymorphism; originality; identification; populations; replacement broodstock; *Acipenser ruthenus*.

**Введение**

Сохранение генетических ресурсов ценных промысловых видов рыб является в настоящее

время актуальной задачей. Резкое сокращение численности осетровых рыб вызвано нерациональным браконьерским промыслом, причинением ущерба местам их обитания, а также нарушением условий

их размножения и нагула [Сытова, 2016]. Весь отряд осетрообразных рыб внесен в списки Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры (CITES – Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), находящимися под угрозой исчезновения [Raymakers, 2006], а также семейство *Acipenseridae* внесено в различные категории Международной Красной книги [Birstein et al., 1997, Raymakers, 2002]. Стерлядь (*Acipenser ruthenus* Linnaeus) является редким видом современной фауны, охрана которого осуществляется как на законодательном уровне в Российской Федерации [Об утверждении ..., 2020], так и за рубежом [Raymakers, 2006].

Генетические исследования осетровых рыб являются одним из эффективных инструментов мониторинга воспроизводства и сохранения естественных популяций и стад в условиях аквакультуры [Dudu, 2011; Козлова и др., 2013, Forp-Bayat, 2015]. Именно в искусственных условиях часто разводятся виды или даже их гибриды из других регионов, что усложняет их корректную видовую идентификацию [Мюге, 2008]. Молекулярно-генетическая идентификация важна как для определения генотипов рыб, выпускаемых в водотоки и водоемы с целью восполнения численности рыб в популяциях, уменьшенной при антропогенной деятельности, а также при разведении стерляди в аквакультуре. Генетическое разнообразие естественных популяций и ремонтно-маточных стад *A. ruthenus* изучено недостаточно.

Цель данной работы – сравнительный анализ генетического разнообразия и генетической оригинальности групп естественных популяций и ремонтно-маточных стад стерляди из Приволжского федерального округа, а также молекулярно-генетическая идентификация стерляди на основании полиморфизма межмикросателлитных маркеров.

## Материал и методы

Объектами для исследования полиморфизма фрагментов ДНК и генетической оригинальности явились три естественные популяции стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, *Acipenseridae*) из Приволжского федерального округа: *Ar\_Km* – из среднего течения р. Камы Волжского речного бассейна (Пермский край); *Ar\_Su* – из нижнего течения р. Сухоны Северо-Двинского речного бассейна (Вологодская обл.); *Ar\_Sh* – из среднего течения р. Вятки Волжского речного бассейна (Кировская обл.); а также три ремонтно-маточных стада стерляди, расположенных в разных регионах Приволжского федерального округа: *Ar\_Ks* – из рыбноводного хозяйства Костромской обл., *Ar\_Sr* – из Саратовского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («Сара-

товНИРО»); *Ar\_Ah* – из рыбноводного хозяйства «ООО Тополь» Пермского края.

Выборка стерляди из р. Камы (*Ar\_Km*) была отловлена на участке, расположенном в 2 км ниже Воткинской ГЭС. В Пермском крае популяции верхнекамской стерляди присвоена III категория редкости [Красная книга Пермского края, 2018]. Данная популяция не относится к верхнекамской стерляди и, соответственно, не занесена в Красную книгу региона, в связи с чем отлов стерляди для сбора плавников был официально разрешен. Естественная популяция стерляди (*Ar\_Su*) была отловлена на участке р. Сухоны, расположенном между населенными пунктами Тотма и Полдарса. В Вологодской обл. *A. ruthenus* присвоена II категория редкости [Красная книга Вологодской области, 2010]. Выборка стерляди (*Ar\_Sh*) была отловлена в нижнем течении р. Вятки около населенного пункта Шурма. В Кировской обл. стерляди присвоена II категория редкости, однако вятская популяция не занесена в Красную книгу данного региона [Красная книга Кировской области, 2014].

Ремонтно-маточное стадо *Ar\_Ks* из рыбноводного хозяйства Костромской обл. было частично отловлено из р. Волги. Выборка из Саратовского филиала ФГБНУ «ВНИРО» *Ar\_Sr* была также частично отловлена из р. Волги. Ремонтно-маточное стадо стерляди из «ООО Тополь» *Ar\_Ah* было закуплено на ЦВР Пермской ГРЭС. Целью создания ремонтно-маточных стад вышеуказанных рыбноводных хозяйств является восполнение численности естественных популяций, а также товарное выращивание.

В каждой из изученных естественных популяций и в каждом ремонтно-маточном стаде было исследовано по 30 особей *A. ruthenus*. Для генетического анализа отбирались фрагменты грудных плавников с последующим выпуском рыбы в водоем, так как стерлядь относится к числу редких видов рыб [Об утверждении Перечня объектов животного мира..., 2020]. Фиксация материала была проведена сразу же после взятия проб в 96%-ном спирте. Хранение материала до выделения ДНК проводилось при температуре +4°C.

Анализ полиморфизма ДНК проведен в группе естественных популяций и в группе ремонтно-маточных стад стерляди, при этом каждая группа включала по 3 выборки и насчитывала по 90 рыб. ДНК выделялась по методике С. Роджерса и А. Бендиха [Rogers, Bendich, 1985], которая была модифицирована с использованием в качестве сорбента PVPP (polyvinylpyrrolidone). ДНК была выделена из тканей плавников 180 особей стерляди. Навеска составляла 100 мг. Качественные характеристики и концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре «NanoDrop 2000» (Thermo Fisher Scientific, США). Для ПЦР концентрацию вы-

равнивали до 10 нг/мкл. Генетический полиморфизм изучен у 180 проб ДНК посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с пятью эффективными ISSR-праймерами, установленными ранее [Комарова и др., 2015]. В данном исследовании применен метод межмикросателлитного анализа (ISSR – Inter Simple Sequence Repeats) полиморфизма ДНК [Zietkiewicz et al., 1994]. Реакционная смесь для ПЦР включала в себя 2 единицы Таг-полимеразы, 2.5 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР, 25 пМ праймера, 2.5 мМ Mg<sup>2+</sup>, 0.25 мМ dNTP, а также 5 мкл матричной ДНК. ПЦР проведена в термоциклере «Му Cycler» (Bio-Rad, USA). При этом использован типичный для ISSR-метода протокол: предварительная денатурация 94°C, 2 мин.; первые пять циклов 94°C, 20 сек.; t° отжига, 10 сек.; 72°C, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек.; t отжига, 5 сек.; 72°C, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин. при 72°C. В зависимости от G/C-состава праймеров температура отжига изменялась от 56 до 64°C. При отрицательном (К-) контроле вместо матрицы в реакционную смесь добавляли 5 мкл деионизированной воды. ПЦР повторяли не менее двух раз. В шести выборках стерляди проанализирован полиморфизм 115 ISSR-PCR маркеров.

Электрофорез ампликонов проведен в 2%-ном агарозном геле в 1x TBE буфере. Фрагменты ДНК в гелях окрашивали бромистым этидием, а после этого фотографировали в системе Gel-Doc XR («Bio-Rad», USA) в проходящем ультрафиолетовом свете. Длину фрагментов ДНК определяли с помощью маркера молекулярной массы (100 bp +1.5 + 3 Kb DNA Ladder; «ООО-СибЭнзим-М», Москва), а также при помощи программы Quantity One в системе гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», USA).

Фрагменты ДНК были представлены в виде матрицы бинарных данных. Полиморфизм по интенсивности не брали в расчет. Для компьютерного анализа использованы программа POPGENE1.31 и специализированный макрос GenAlEx6 для MS-Excel, с помощью которых определены общепризнанные показатели генетического разнообразия. Типичные и специфичные маркеры были установлены в соответствии с методикой определения коэффициента генетической

оригинальности – КГО [Потокина, Александрова, 2008].

Генетическая структура популяций и стад была установлена и представлена в виде следующих параметров [Nei, 1975]: во всей популяции ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_T$ ) как мера общего генного разнообразия; в отдельной популяции ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_S$ ) как мера ее внутривидового разнообразия. Кроме того, установлен показатель подразделенности популяций, или  $G_{ST}$ , который показывает долю межпопуляционного генетического разнообразия в общем генетическом разнообразии.

Молекулярно-генетическая идентификация выполнена по методике С.В. Боронниковой [2008]. Для проверки идентификационных маркеров опыт повторяли дважды. Для выявления идентификационных маркеров, общих для видов одного рода, так называемых «родовых» использовали пробы ДНК осетра сибирского (*Acipenser baerii* Brandt). Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием стандартных для популяционно-генетических исследований методов в программе STATISTICA 6.0.

### Результаты и их обсуждение

При определении генетического полиморфизма у всех особей из группы естественных популяций *A. ruthenus* было выявлено 103 ISSR-PCR маркера (табл. 1), из них 96 оказались полиморфными ( $P_{95} = 0.932$ ). В группе же ремонтно-маточных стад *A. ruthenus* было установлено 106 ISSR-PCR маркеров, из них полиморфными оказались 90 ( $P_{95} = 0.849$ ). Итак, доля полиморфных локусов незначительно выше в группе естественных популяций стерляди. Число выявленных ISSR-PCR маркеров *A. ruthenus* в группе естественных популяций изменялось в зависимости от праймера от 18 (CR-212 [(CT)<sub>8</sub>TG]) до 24 (X11 [(AGC)<sub>6</sub>G]). Число установленных ISSR-PCR маркеров *A. ruthenus* в группе ремонтно-маточных стад изменялось больше, а именно – от 16 (CR-212 [(CT)<sub>8</sub>TG]) до 26 (X11 [(AGC)<sub>6</sub>G]). Размеры выявленных ISSR-PCR маркеров (табл. 1) в обеих исследованных группах варьировали в диапазоне от 200 (ISSR-9) [(ACG)<sub>7</sub>G] до 1500 п.н. (X9) [(ACC)<sub>6</sub>G].

Таблица 1

**Характеристика ISSR-PCR маркеров группы естественных популяций и группы ремонтно-маточных стад *A. ruthenus***

ISSR-праймеры	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Длина маркеров, п.н	Общее число полиморфных ISSR-PCR маркеров (их частота)			
			Группа естественных популяций ( <i>Ar_Km</i> , <i>Ar_Su</i> , <i>Ar_Sh</i> )		Группа ремонтно-маточных стад ( <i>Ar_Ks</i> , <i>Ar_Sr</i> , <i>Ar_Ah</i> )	
			всего	полиморфных	всего	полиморфных
CR-212	(CT) <sub>8</sub> TG	230-960	18	16 (0.889)	16	16 (1.000)
X11	(AGC) <sub>6</sub> G	280-1000	24	22 (0.917)	24	21 (0.875)
CR-215	(CA) <sub>6</sub> GT	210-1000	19	17 (0.895)	19	17 (0.895)

Окончание табл. 1

ISSR-праймеры	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Длина маркеров, п.н	Общее число полиморфных ISSR-PCR маркеров (их частота)			
			Группа естественных популяций ( <i>Ar_Km</i> , <i>Ar_Su</i> , <i>Ar_Sh</i> )		Группа ремонтно-маточных стад ( <i>Ar_Ks</i> , <i>Ar_Sr</i> , <i>Ar_Ah</i> )	
			всего	полиморфных	всего	полиморфных
ISSR-9	(ACG) <sub>7</sub> G	200-800	20	20 (1.000)	21	14 (0.667)
X9	(ACC) <sub>6</sub> G	200-1500	22	21 (0.955)	26	22 (0.846)
Всего ISSR-PCR маркеров			103	96 (0.932)	106	90 (0.849)

Примечание. Группа естественных популяций включает *Ar\_Km* – из р. Камы; *Ar\_Su* – из р. Сухоны; *Ar\_Sh* – из р. Вятки; группа ремонтно-маточных стад включает *Ar\_Ks* – из рыбоводного хозяйства Костромской обл.; *Ar\_Sr* – из Саратовского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («СаратовНИРО»), *Ar\_Ah* – из «ООО Тополь»; CR-212, X11, CR-215, ISSR-9, X9 – обозначения праймеров.

Ожидаемая гетерозиготность ( $H_E$ ) в группе естественных популяций *A. ruthenus* ( $H_E = 0.294$ ) также незначительно выше (табл. 2), чем в другой группе ( $H_E = 0.269$ ). Эффективное число установленных аллелей на locus ( $n_e$ ) оказалось выше в первой группе, то есть у естественных популяций, и составило 1.477. В обеих группах обнаружено по три редких аллеля (табл. 2). При сравнении уста-

новленных показателей генетического разнообразия, группы естественных популяций ( $P_{95} = 0.932$ ;  $H_E = 0.294$ ;  $n_e = 1.477$ ) и группы ремонтно-маточных стад ( $P_{95} = 0.849$ ;  $H_E = 0.269$ ;  $n_e = 1.434$ ), с использованием традиционных критериев Фишера и Стьюдента, установлено, что их разница незначима (табл. 2).

Таблица 2

#### Генетическое разнообразие группы естественных популяций и группы ремонтно-маточных стад *A. ruthenus*

Группа	Показатели генетического разнообразия			
	$P_{95}$	$H_E$	$h$	$n_e$
Группа естественных популяций	0.932	0.294 (0.015)	0.293 (0.148)	1.479 (0.312)
Группа ремонтно-маточных стад	0.849	0.269 (0.015)	0.269 (0.156)	1.433 (0.311)
Критерий	Фишера (F)			Стьюдента (t)
Значение критерия	F = 1.815	F = 0.373	F = 0.207	t = 0.100
Сравнение с $F_{st}$ или $t_{st}$	1.815 < 1.96	0.373 < 1.96	0.207 < 1.96	0.100 < 1.98

Примечание.  $P_{95}$  – доля полиморфных локусов;  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность;  $n_e$  – эффективное число аллелей на locus;  $h$  – доля редких морф; в скобках даны стандартные отклонения; состав групп естественных популяций и ремонтно-маточных стад указаны в табл. 1.

Доля редких морф  $h$  (в нашем случае редких фрагментов ДНК) указывает, что сбалансированность структуры генетического разнообразия в группе естественных популяций по сравнению с группой ремонтно-маточных стад различается незначительно.

Коэффициент генетической оригинальности из 6 изученных выборок выше у ремонтно-маточного стада Костромской обл. (КГО = 1.439). Это означает, что генофонд данной выборки стерляди имеет тенденцию к специфичности, а генофонд выборки из естественной популяции р. Сухоны (КГО = 0.615) менее гетерогенен и несет больше типичных аллелей. Одной из причин низкой генетической гетерогенности может быть тот факт, что исследуемые особи родственны между собой, как было показано в другом исследовании стерляди на основании анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей фрагмента локуса *cut b* мтДНК [Слынько и др., 2017]. Вместе с тем КГО выше в группе естественных популяций и равен 2.040, чем в группе ремонтно-маточных стад

*A. ruthenus* (КГО=1.928). Это означает, что генофонды естественных популяций в своем составе содержат больше специфичных аллелей, а генофонды ремонтно-маточных стад – больше типичных аллелей. Таким образом, установленные показатели генетического разнообразия и новой характеристики генетической оригинальности (КГО) оказались незначительно выше в первой группе естественных популяций, по сравнению с этим показателем во второй группе ремонтно-маточных стад стерляди.

Анализ выявленной генетической структуры у группы естественных популяций и у группы ремонтно-маточных стад *A. ruthenus* показал, что в так называемой общей популяции ожидаемая доля гетерозиготных генотипов ( $H_T$ ), а также в отдельной группе ожидаемая доля гетерозиготных генотипов по всем локусам ( $H_S$ ) незначительно выше в первой группе естественных популяций, чем во второй группе ремонтно-маточных стад. Коэффициент генетической подразделенности ( $G_{ST}$ ), так же незначительно выше в группе естественных попу-

ляций и равен 0,377 (табл. 3).

Наибольшая дифференциация в группе естественных популяций *A. ruthenus* установлена с использованием праймера X11 [(AGC)<sub>6</sub>G]. В группе ремонтно-маточных стад праймер CR-212 [(СТ)<sub>8</sub>TG] выявил наибольшую степень дифференциации среди исследованных выборок (табл. 3). Коэффициент подразделенности популяций, как итоговый показатель ( $G_{ST}$ ), показывает, что на

межпопуляционную компоненту в первой группе естественных популяций приходится 37.7% всего генетического разнообразия. Почти идентичный показатель в группе ремонтно-маточных стад – 37.0%. Итак, в двух изученных группах стерляди степень дифференциации выборок оказалась выше среднего значения и почти одинаковой у этих двух групп.

Таблица 3

**Генетическая структура группы естественных популяций и группы ремонтно-маточных стад *A. ruthenus***

Выборка	Показатель	ISSR-PCR праймер					На группу
		CR-212	X11	CR-215	ISSR-9	X9	
Группа естественных популяций	$H_T$	0.309 (0.019)	0.307 (0.025)	0.338 (0.023)	0.265 (0.023)	0.330 (0.026)	0.310 (0.023)
	$H_S$	0.201 (0.009)	0.162 (0.015)	0.190 (0.008)	0.196 (0.012)	0.220 (0.015)	0.193 (0.012)
	$G_{ST}$	0.348	0.474	0.438	0.259	0.331	<b>0.377</b>
Группа ремонтно-маточных стад	$H_T$	0.312 (0.019)	0.293 (0.025)	0.334 (0.021)	0.244 (0.043)	0.270 (0.025)	0.288 (0.027)
	$H_S$	0.169 (0.011)	0.173 (0.012)	0.229 (0.014)	0.148 (0.019)	0.188 (0.017)	0.181 (0.015)
	$G_{ST}$	0.456	0.407	0.313	0.392	0.305	<b>0.370</b>

Примечание.  $H_T$  – доля гетерозиготных генотипов;  $H_S$  – доля гетерозиготных генотипов внутри выборки;  $G_{ST}$  – показатель подразделенности популяций; в скобках даны стандартные отклонения; состав групп естественных популяций и ремонтно-маточных стад указаны в табл. 1; CR-212, X11, CR-215, ISSR-9, X9 – обозначения праймеров.

Молекулярно-генетическая идентификация проведена с использованием молекулярных маркеров и их характеристик, определенных на основании частот аллелей, полученных при молекулярно-генетическом анализе шести выборок стерляди. На основе ISSR-спектров *A. ruthenus*, полученных при электрофорезе продуктов ПЦР с пятью эффективными праймерами, удалось установить идентификационные маркеры или их сочетания для трёх изученных популяций и трёх ремонтно-маточных стад этого вида.

При сравнении спектров амплификаций стерляди (*A. ruthenus*) и близкородственного вида осетра сибирского (*A. baerii*) были выявлены мономорфные родовые ISSR-PCR маркеры, характерные для обоих видов: ACIP<sub>T</sub>230<sub>ISSR9</sub>; ACIP<sub>T</sub>380<sub>CR212</sub>; ACIP<sub>T</sub>250<sub>CR212</sub>; ACIP<sub>T</sub>430<sub>CR215</sub>; ACIP<sub>T</sub>210<sub>CR215</sub>; ACIP<sub>T</sub>170<sub>X11</sub>.

Для изученных выборок *A. ruthenus* установлены пять видовых ISSR-PCR маркеров, выявленных у всех изученных рыб: Ar<sub>V</sub>1030<sub>CR215</sub>; Ar<sub>V</sub>730<sub>CR215</sub>; Ar<sub>V</sub>250<sub>CR215</sub>; Ar<sub>V</sub>660<sub>X11</sub>; Ar<sub>V</sub>450<sub>X11</sub>. Также, при молекулярно-генетической идентификации, были установлены полиморфные фрагменты или их сочетания для каждой выборки, встречающиеся с частотой от 0.05 до 0.95.

Для апробации подходов идентификации изученных выборок *A. ruthenus* была проведена анонимная идентификация проб ДНК неизвестной выборки на основании анализа идентификационных маркеров. Процедура анонимной идентификации составила несколько этапов:

1) проведение ISSR-анализа полиморфизма ДНК: с 30 пробами ДНК неизвестной выборки была поставлена ПЦР с 5 эффективными ISSR-праймерами для *A. ruthenus* (CR-212, X11, CR-215, ISSR-9, X9);

2) компьютерный анализ: полученные ISSR-спектры неизвестного образца сравнивались с ISSR-профилями изученных ранее выборок *A. ruthenus*. При сравнении полученных ISSR-профилей четко были выявлены мономорфные фрагменты, соответствующие видовым фрагментам *A. ruthenus* – Ar<sub>V</sub>320<sub>ISSR9</sub>; Ar<sub>V</sub>1030<sub>CR215</sub>; Ar<sub>V</sub>730<sub>CR215</sub>; Ar<sub>V</sub>250<sub>CR215</sub>; Ar<sub>V</sub>660<sub>X11</sub>; Ar<sub>V</sub>450<sub>X11</sub>; следовательно, можно сделать вывод, что данная ДНК неизвестного образца принадлежит стерляди;

3) для идентификации выборки, к которой принадлежит неизвестный образец ДНК, было проведено сравнение полиморфных ISSR-PCR маркеров. На электрофореграмме неизвестного образца стерляди с праймерами X11 и X9 присутствуют фрагменты 760<sub>X11</sub>, 870<sub>X9</sub> с частотой более 0.500, которые встречаются только у естественной популяции *Ar\_Sh* из р. Вятки. При дальнейшей процедуре сравнения ISSR-паттернов исследованной ранее популяции *Ar\_Sh* и неизвестного образца, четко прослеживалось совпадение всех маркеров, амплифицированных в ПЦР с пятью ISSR-праймерами, а следовательно, данный неизвестный тестируемый образец принадлежит естественной популяции *Ar\_Sh* из р. Вятки *A. ruthenus*.

Таким образом, для *A. ruthenus* были установлены шесть общих для двух видов рода *Acipenser*,

то есть идентификационных родовых фрагментов; а также пять видовых фрагментов.

По результатам проведенного исследования были разработаны следующие рекомендации для рыбоводных хозяйств:

1. Для сохранения и восстановления генетических ресурсов *A. ruthenus* рекомендуется использовать естественную популяцию из р. Вятки (*Ar\_Sh*), так как у нее выявлены самые высокие среди установленных показатели генетического разнообразия ( $P_{95} = 0.776$ ;  $H_E = 0.181$ ;  $n_e = 1.313$ ).

2. С целью сохранения типичных для региона исследований аллелей рекомендуется использовать естественную популяцию стерляди из р. Сухоны (КГО = 0.615).

3. Для обоснования выпуска молоди в р. Каму, Вятку или Сухону также рекомендуется проведение молекулярно-генетической идентификации с обобщением в виде генетических паспортов и с указанием генетического сходства на основании полиморфизма установленных молекулярных маркеров.

### Заключение

В ходе молекулярно-генетического анализа в группе естественных популяций *A. ruthenus* было выявлено 103 ISSR-PCR маркера, из которых 96 оказались полиморфными ( $P_{95} = 0.932$ ), а в группе ремонтно-маточных стад – 106 ISSR-PCR маркеров, из которых 90 оказались полиморфными ( $P_{95} = 0.849$ ). Итак, доля полиморфных локусов незначительно выше в группе естественных популяций стерляди.

Установленные показатели генетического разнообразия оказались незначительно выше в первой группе естественных популяций по сравнению с показателями второй группы ремонтно-маточных стад стерляди. Коэффициент генетической оригинальности (КГО) также выше в группе естественных популяций *A. ruthenus*. Это означает, что генофонд естественных популяций стерляди имеет тенденцию к специфичности, а генофонд ремонтно-маточных содержит больше типичных аллелей.

Проведенный анализ генетической структуры двух групп (естественных популяций и ремонтно-маточных стад) *A. ruthenus* показал, что коэффициент подразделенности так же незначительно выше ( $G_{ST} = 0.377$ ) в группе естественных популяций. Как и в других исследованиях [Побединцева, 2016], полученные данные свидетельствуют о сложной популяционной структуре изученных выборок стерляди.

Для *A. ruthenus* были установлены шесть идентификационных родовых ISSR-PCR маркеров; пять видовых ISSR-PCR маркеров, а также перечень и сочетаемость полиморфных маркеров для молекулярно-генетической идентификации изученных

выборок. Проведена анонимная идентификация проб ДНК неизвестной выборки стерляди, которая подтвердила эффективность выполненной молекулярно-генетической идентификации. Полученные данные о генетическом разнообразии групп естественных популяций и ремонтно-маточных стад могут быть использованы для сохранения генофондов стерляди, характерных для того или иного региона.

Работа выполнена в рамках государственного задания по науке ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» № FSNF-2020-0008 (регист. номер АААА-А20-120081990069-3).

### Список литературы

- Боронникова С.В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редких и находящихся под угрозой уничтожения видов растений. Пермь, 2008. 120 с.
- Козлова Н.В. и др. Применение молекулярно-генетических исследований в аквакультуре осетровых рыб // Вестник Астраханского государственного технического университета. Сер. Рыбное хозяйство. 2013. № 3. С. 113–117.
- Комарова Л.В. Анализ полиморфизма ДНК стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) из двух естественных популяций и искусственного стада // Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии. Пермь, 2015. С. 7–9.
- Красная книга Вологодской области. Т. 3. Животные / под ред. Н.Л. Болотовой и др. Вологда: Полиграф-Книга, 2010. 216 с.
- Красная книга Кировской области: Животные. Растения. Грибы / под ред. О.Г. Барановой и др. Киров, 2014. 336 с.
- Красная книга Пермского края / под ред. М.А. Бакланова. Пермь: Алдари, 2018. 230 с.
- Красная книга Российской Федерации. Животные / под ред. А.С. Замотайлова. М., 2001. 863 с.
- Об утверждении Перечня объектов животного мира, занесенных в Красную книгу Российской Федерации: Приказ Министерства природных ресурсов и экологии РФ, № 162 от 24 марта 2020 г. URL: <https://docs.cntd.ru/document/564578614>
- Побединцева М.А. Генетическая структура популяции и филогеография стерляди *Acipenser ruthenus* и сибирского осетра *Acipenser baerii* в бассейне реки Обь // Материалы 54 Междунар. науч. студ. конф. МНСК-2016. Новосибирск, 2016. С. 100.
- Потокина Е.К., Александрова Т.Г. Методы классификации внутривидового разнообразия по результатам молекулярного маркирования // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: материалы Всерос. конф. Петрозаводск, 2008. Ч. 3. С. 62–65.
- Слынько Е.Е. и др. Биологические параметры ре-

- интродуцированной стерляди в реках Северо-Двинского бассейна // Повышение уровня и качества биогенного потенциала в животноводстве: сб. III Междунар. науч.-практ. конф. Ярославль, 2017. С. 179–183.
- Сытова М.В. Разработка научных подходов развития осетрового хозяйства на основе прослеживаемости продукции из осетровых рыб // Труды ВНИРО. 2016. Т. 159. Р. 143–150.
- Birstein V.J. et al. Phylogeny of the *Acipenseriformes*: cytogenetic and molecular approaches // *Environmental Biology of Fishes*. 1997. Vol. 48. P. 127–155.
- Dudu A. et al. Nuklear markers of Danube sturgeons hybridization // *Molecular Sciences*. 2011. Vol. 12. P. 6796–6809.
- Fopp-Bayat D. et al. Genetic analysis of six sterlet (*Acipenser ruthenus*) populations - recommendations for the plan of restitution in the Dniester River // *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2015. Vol 14(3). P. 634–645.
- Nei M. et al. Molecular population genetics and evolution. North-Holland Publishing Company, 1975. 288 p.
- Raymakers C. International trade in sturgeon and paddlefish species—the effect of CITES listing // *International Review of Hydrobiology: A Journal Covering all Aspects of Limnology and Marine Biology*. 2002. Vol. 87, № 5–6. P. 525–537.
- Raymakers C. CITES, the Convention on International trade in Endangered Species of wild fauna and flora: its role in the conservation of *Acipenseriformes* // *Journal of Applied Ichthyology*. 2006. Vol. 22. P. 53–65.
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Molecular Biology*. 1985. Vol. 5, № 19. P. 69–76.
- Zietkiewicz E. et al. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. 1994. Vol. 20. P. 176–180.
- [Red Data Book of the Vologda Region. V. 3. Animals]. Vologda, Poligraf-Kniga Publ., 2010. 216 p. (In Russ.).
- Baranova O.G., Lachokhi E.P., Ryabov V.M. *Krasnaja kniga Kirovskoj oblasti. Životnye, Rasteniya, Griby* [Red Book of the Kirov region. Animals, Plants, Fungi]. Kirov, 2014. 363 p. (In Russ.).
- Baklanov M.A. *Krasnaja kniga Permskogo kraja* [The Red Book of Perm region]. Perm, Aldari Publ., 2018. 230 p. (In Russ.).
- Zamotajlov A.S. *Krasnaja kniga Rossijskoj Federacii. Životnye* [The Red Book of the Russian Federation. Animals] Moscow, 2001. 863 p. (In Russ.).
- Ob utverždenii Perečnja ob"ektov životnogo mira, zanesennyh v Krasnuju knigu Rossijskoj Federacii [About the approval of the List of Objects of the Animal world listed in the Red Book of the Russian Federation: Order of the Ministry of Natural Resources and Ecology of the Russian Federation, No. 162 of March 24, 2020.] Available at: <https://docs.cntd.ru/document/564578614> (In Russ.).
- Pobedinceva M.A. [Genetic structure of populations and phylogeography of the sterlet *Acipenser ruthenus* and Siberian sturgeon *Acipenser baerii* in the Ob River basin]. *Materialy 54 meždunarodnoj naučnoj studenčeskoj konferencii* [Proceedings of the 54th International Scientific Student Conference MNSC-2016] Novosibirsk, 2016, p. 100. (In Russ.).
- Potokina E.K., Aleksandrova T.G. [Methods for classifying intraspecific diversity based on the results of molecular labeling]. *Fundamental'nye i prikladnye problemy botaniki v načale XXI veka* [Fundamental and applied problems of botany at the beginning of the XXI century. Materials of the All-Russian Conference.]. Petrozavodsk, 2008, pp. 62-65. (In Russ.).
- Slyn'ko E.E. et al. [Biological parameters of reintroduced sterlet in the rivers of the North Dvina basin]. *Povyšenie urovnja i kačestva biogennogo potenciala v životnovodstve* [Improving the level and quality of biogenic potential in animal husbandry: collection of the III International Scientific and Practical Conference]. Yaroslavl, 2017, pp. 179-183. (In Russ.).
- Sytova M.V. [Development of scientific approaches to the development of sturgeon farming based on the traceability of products from sturgeon fish]. *Trudy VNIRO*. V. 159 (2016): pp. 143-150. (In Russ.).
- Birstein V.J. et al. Phylogeny of the *Acipenseriformes*: cytogenetic and molecular approaches. *Environmental Biology of Fishes*. V. 48 (1997): pp. 127-155.
- Dudu A. et al. Nuklear markers of Danube sturgeons hybridization. *Molecular Sciences*. V. 12 (2011): pp. 6796-6809.
- Fopp-Bayat D. et al. Genetic analysis of six sterlet (*Acipenser ruthenus*) populations - recommendations for the plan of restitution in the Dniester River. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. V. 14(3) (2015): pp. 634-645.
- Nei M. et al. Molecular population genetics and evolution.

## References

Boronnikova S.V. *Molekuljarno-genetičeskaja identifikacija i pasportizacija redkich i nachodjaščsja pod ugroznoj uničtoženija vidov rastenij* [Molecular genetic identification and certification of rare and endangered plant species]. Perm, 2008. 120 p. (In Russ.).

Kozlova N.V. et al. [Application of molecular genetic studies in sturgeon aquaculture]. *Vestnik AGTU. Ser. Rybnoe chozjajstvo*, N 3 (2013): pp. 113-117. (In Russ.).

Komarova L.V. [Analysis of DNA polymorphism in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) from two natural populations and an artificial herd]. *Fundamental'nye i prikladnye issledovanija v biologii i èkologii* [Basic and applied research in biology and ecology]. Perm, 2015, pp. 7-9. (In Russ.).

Bolotova N.L., Ivanter H.V., Krivokhatskii V.A., eds. *Krasnaja kniga Vologodskoj oblasti. T. 3. Životnye*

- lution. North-Holland Publishing Company, 1975. 288 p.
- Raymakers C. CITES, the Convention on International trade in Endangered Species of wild fauna and flora: its role in the conservation of Acipenseriformes. *Journal of Applied Ichthyology*. V. 22 (2006): pp. 53-65.
- Raymakers C. International trade in sturgeon and paddlefish species—the effect of CITES listing. *International Review of Hydrobiology: A Journal Covering all Aspects of Limnology and Marine Biology*. V. 87, N 5 (2002): pp. 525-537.
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*. V. 5, N 19 (1985): pp. 69-76.
- Zietkiewicz E. et al. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. V. 20 (1994): pp. 176-180.

Поступила в редакцию 18.03.2021

### Об авторах

Комарова Лидия Васильевна, ассистент кафедры ботаники и генетики растений ФГАОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»  
**ORCID:** orcid.org/0000-0002-7021-0017  
 614068, Пермь, ул. Букирева, 15;  
 arealfreedom@mail.ru; (342)2396229

Пелеева Альбина Рафиковна, научный сотрудник ООО «Исследовательский Центр «ФитоИнженерия»  
**ORCID:** 0000-0002-6122-0934  
 141880, Московская область, Дмитровский район, с. Рогачево, ул. Московская, стр. 58;  
 al.peleeva@yandex.ru; 8-9963250084

Костицына Наталья Вячеславовна, кандидат биологических наук, доцент каф. зоологии позвоночных и экологии ФГАОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»  
**ORCID:** orcid.org/0000-0002-8681-2135  
 614068, Пермь, ул. Букирева, 15;  
 biology.psu@yandex.ru, (342)2396353

Мельникова Алла Геннадьевна, кандидат биологических наук, руководитель Пермский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»  
**ORCID:** orcid.org/0000-0003-2717-5188  
 614002, г. Пермь, ул. Чернышевского, д. 3;  
 permniro@vniro.ru; +7 (342) 258-46-36

Боронникова Светлана Витальевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники и генетики растений ФГАОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»  
**ORCID:** 0000-0002-5498-8160  
 614068, Пермь, ул. Букирева, 15;  
 SVBoronnikova@yandex.ru; (342)2396229

### About the authors

Komarova Lidiya Vasilievna, assistant of Department of botany and plant genetics Perm State University.  
**ORCID:** orcid.org/0000-0002-7021-0017  
 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614068;  
 arealfreedom@mail.ru; (342)2396229

Peleeva Albina Rafikovna, Researcher PhytoEngineering Research Center LLC.  
**ORCID:** 0000-0002-6122-0934  
 141880, Moscow region, Dmitrovsky district, s. Rogachevo, st. Moscow, p. 58;  
 al.peleeva@yandex.ru; 8-9963250084

Kostitsyna Natalia Vyacheslavovna, candidate of biology, associate professor of the Department vertebrate zoology and ecology Perm State University.  
**ORCID:** orcid.org/0000-0002-8681-2135  
 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614068;  
 biology.psu@yandex.ru, (342)2396353

Melnikova Alla Gennadijevna, candidate of biology, Head Perm branch of the FSBSI “Russian Federal Research Institute of Fisheries and oceanography”, Perm branch of “VNI-RO” (“PermNIRO”).  
**ORCID:** orcid.org/0000-0003-2717-5188  
 123, Leninskije gory str., Moscow, Russia, 119991;  
 permniro@vniro.ru; +7 (342) 258-46-36

Boronnikova Svetlana Vitalievna, doctor of biology, professor, head of the Department of botany and plant genetics Perm State University.  
**ORCID:** 0000-0002-5498-8160  
 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614068;  
 SVBoronnikova@yandex.ru; (342)2396229

### Информация для цитирования:

Полиморфизм ДНК, генетическая оригинальность и идентификация популяций и ремонтно-маточных стад стерляди (*Acipenser ruthenus*) / Л.В. Комарова, А.Р. Пелеева, Н.В. Костицына, А.Г. Мельникова, С.В. Боронникова // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2021. Вып. 1. С. 53–60. DOI: 10.17072/1994-9952-2021-1-53-60.

Komarova L.V., Peleeva A.R., Kostitsyna N.V., Melnikova A.G., Boronnikova S.V. [DNA polymorphism, genetic originality and identification of sterlet populations and replacement broodstock (*Acipenser ruthenus*)]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 1 (2021): pp. 53-60. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2021-1-53-60.





