

**АНАЛИЗ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ХРОМОСОМНОЙ ДНК
ЗЕЛЕННОГО САХАЛИНСКОГО ОСЕТРА (*ACIPENSER MIKADOI*,
HELGENDORF, 1892)**

Е.В. Микодина, А.Е. Барминцева, А.А. Волков, А.А. Сергеев,
Д.А. Зеленина и В.А. Барминцев

Федеральное государственное унитарное предприятие Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), Российская Федерация, 107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, д.17.

Американский зеленый, осетр *Acipenser medirostris* Ayres, 1854 относится к отряду Осетрообразных (Acipenseriformes), семейству Осетровых (Acipenseridae). Ранее, считалось, что у него существует азиатский подвид - *Acipenser medirostris mikadoi* (Артюхин, Андронов, 1990, Решетников и др. 1997), или даже, как контрпаллиатив, – азиатский вид: *Acipenser mikadoi* Helgendorf, 1892.

Некоторые данные современных кариологических и молекулярно-генетических методов исследований указывают на то, что представители американской и азиатской популяций зеленого осетра действительно являются двумя самостоятельными видами: они имеют различное число хромосом и, соответственно, уровень пloidности (Birstein & Bernis, 1997; Birstein & De Salle, 1998; Ludvig et al., 2001, Mecklenburg et al., 2002).

Ссылаясь на полученные данные, американские исследователи однозначно считают зеленых осетров, населяющих американское и азиатское побережья Тихого океана, различными видами: американский зеленый осетр – *A. medirostris* и азиатский зеленый (сахалинский) осетр – *A. mikadoi*.

Вместе с тем, по образу жизни и морфометрическим данным оба вида практически идентичны и занимают одну и ту же экологическую нишу по обе стороны Тихого океана. А само по себе различие в пloidности геномов – лишь предпосылка для видообразовательного процесса.

Далее, из-за малого количества образцов, пригодных для генетического анализа, которые необходимо собрать в разных точках ареала обитания азиатской популяции, нельзя априори утверждать, что по всему Северо-Азиатскому побережью Тихого океана обитает только *A. mikadoi*. Не исключено, что наряду с этим видом в эстуариях рек, например, Приморья, Хабаровского края и о. Сахалин, может встречаться и *A. medirostris*. А, следовательно, нельзя исключить возможность существования общих фрагментов ареала обитания и, что важнее всего, размножения.

Вместе с тем, зеленый сахалинский осетр, ставший не просто редким, а в полном смысле этого слова, исчезающим видом, нуждается в принятии неотложных мер по его сохранению и скорейшему восстановлению.

В настоящее время на Охотском ЛРЗ ведется работа по формированию ремонтно-маточного стада сахалинского осетра, поэтому начало рыбоводных работ с этим стадом позволит сделать первый, достаточно обнадеживающий шаг, к реинтродукции данного вида в места естественного обитания. Всего в РМС Охотского ЛРЗ насчитывается 63 особи 1991 года рождения, происходящие от производителей, выловленных в р. Тумнин (Датта) Хабаровского края. В силу малой численности исходных производителей полученное стадо не отличается генетическим разнообразием. При попытке его использования для создания новых генераций высока опасность скрещивания между собой сибсов, что неминуемо скажется на жизнеспособности потомства. Избежать инбредной депрессии, тем не менее, можно. Для этого необходимо выполнить индивидуальное мечение производителей с параллельным отбором проб тканей для проведения ДНК-профайлинга.

Полученные данные помогут определить полиморфность и характерные индивидуальные наборы аллелей некоторых микросателлитных локусов, что будет являться в дальнейшем генетическим паспортом производителя. Эта же процедура при сравнительном анализе одноименных локусов американских и азиатских зеленых осетров поможет выявить их дифференциацию на уровне вид-подвид.

Праймеры для проведения микросателлитного анализа были синтезированы нами согласно опубликованным данным (Zane et al., 2002; Henderson-Arzapalo and King, 2002; Welsh et al., 2003). Всего было использовано восемь микросателлитных локусов: An20, AfuG41, AfuG51, AfuG113, AfuG123, AoxD161, AoxD165 и AoxD241.

Для выделения ДНК использовали эталонные образцы тканей зеленого осетра из РНКЭГМ ВНИРО: Охотский ЛРЗ (10 экз.), из р. Тумнин (2 экз.) из Конаковского ОРЗ (6 экз.), источником которых является также р. Тумнин. Следует отметить, что пробы от производителей РМС Охотского ЛРЗ были собраны в 2003 г. без учета индивидуальных биологических характеристик каждой особи в отдельности.

Полученные в процессе полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификаты фракционировали электрофоретически в 6%-ном полиакриламидном геле. На основании анализа электрофореграмм по каждому из локусов были выявлены аллели, характерные для исследуемых особей. Шесть из восьми рассмотренных локусов оказались полиморфными и, таким образом, подходящими для проведения микросателлитного анализа. Пример электрофореграммы продуктов амплификации представлен на рисунке 1.

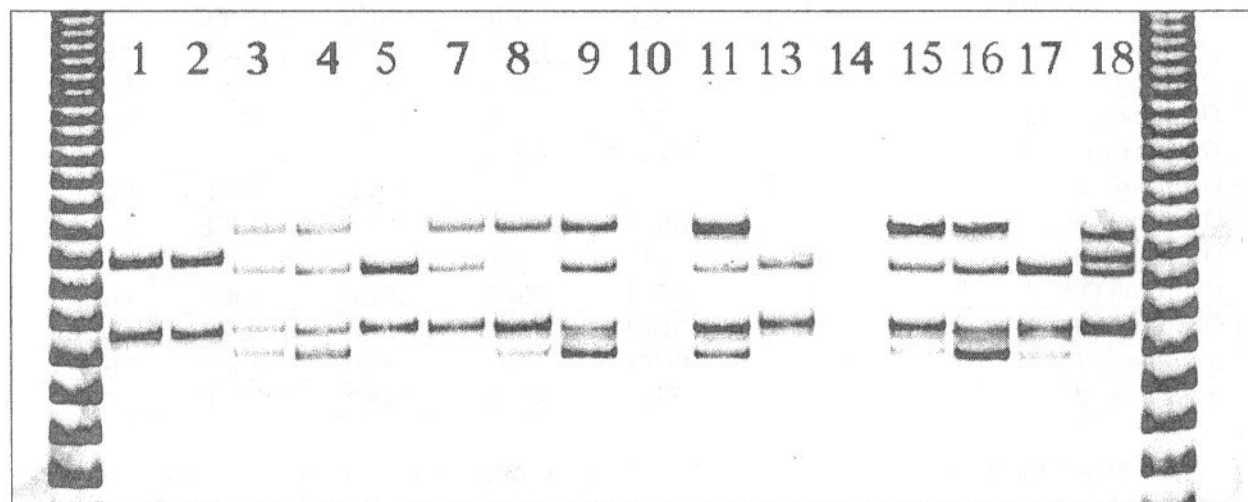


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации микросателлитного локуса AfuG113. На дорожках: 1 – *A. micadoi* MED0001; 2 – *A. micadoi* MED0002; 3 – *A. micadoi* MED0003; 4 – *A. micadoi* MED0004; 5 – *A. micadoi* MED0005; 7 – *A. micadoi* MED0007; 8 – *A. micadoi* MED0008; 9 – *A. micadoi* MED0009; 10 – *A. micadoi* MED0010; 11 – *A. micadoi* MED0011; 13 – *A. micadoi* MED0013; 14 – *A. micadoi* MED0014; 15 – *A. micadoi* MED0015; 16 – *A. micadoi* MED0016; 17 – *A. micadoi* MED0017; 18 – *A. micadoi* MED0018. Маркеры молекулярных масс расположены на электрофореграмме справа и слева.

Как видно из рисунка, набор аллелей (в основном, от 2 до 4), у каждой особи свой, но у отдельных особей совпадает. В принципе, такое возможно, поэтому для анализа и используют несколько локусов.

Для определения генотипа исследуемых особей было подсчитано количество аллелей по каждому из локусов в отдельности. Из таблицы 1 видно, что практически для всех образцов свойственна своя индивидуальная комбинация аллелей по каждому из локусов, причем установлено, что наследование по данным локусам происходит независимо. Следует особо отметить, что для ряда образцов характерен полностью идентичный набор аллелей по всем локусам (данные пары отмечены в таблице 1 жирным курсивом). Наиболее вероятное объяснение этому факту может состоять в том, что в процессе сбора проб у одной и той же рыбы образец ткани был взят дважды (но в разное время, поскольку датировка образцов расходитя на один-два года!). Таким обра-

зом, можно утверждать, что с помощью микросателлитного анализа была установлена аутентичность происхождения трех пар образцов .

Таблица 1. Аллельный состав шести микросателлитных локусов зеленого (сахалинского) осетра

Происхождение и номер образца	Микросателлитные локусы					
	AfuG41	AoxD165	An 20	AoxD161	AfuG113	AfuG123
Конаковский ОРЗ 1	CDDE	AGGH	ABDE	CCCC	CCEF	BCEF
Конаковский ОРЗ 2	CDDE	AGGH	ABDE	CCCC	CCEF	BCEF
Конаковский ОРЗ 3	BCCE	BBFH	BEEE	ACCC	ADEF	ABDF
Конаковский ОРЗ 4	BCCE	BBFH	BEEE	ACCC	ADEF	ABDF
Конаковский ОРЗ 5	CDDE	ABGH	ABDE	BCCC	DDEE	CEFF
Охотский ОРЗ 1	DDEF	CCDE	BBEE	AACC	ADEE	ABCC
Охотский ОРЗ 2	CDDE	ABCD	CCEE	CCCC	AAEE	AADD
Охотский ОРЗ 3	ACDF	BCCG	ABBC	ACCC	ADEF	ABDF
Охотский ОРЗ 4	ACDF	BCCG	ABBC	ACCC		
Охотский ОРЗ 5	BDEF	ACCE	BCCE	AACC	ADEF	BBCC
Охотский ОРЗ 6	CDEF	BCCE	BBCC	CCCC	DDEE	AACC
Охотский ОРЗ 7	ACDF	CCHH	ABBB	AAAC		
Охотский ОРЗ 8	CDEF	ACDD	BBEE	CCCC	ADEF	ABEF
Охотский ОРЗ 9	ACDD	CDDF	BBCC	ACCC	ADEF	ADDF
р.Тумнин 17	BCDD	ACFH	BBDE	AACC	DDEF	EEFF
р.Тумнин 18	CCDD	CCDD	BEEE	AABC	BCDE	DFFF

Буквенными символами от “А” до “Н” в таблице отмечены аллели, имеющие характерный размер только для данного локуса: А – самый тяжелый, Н – наиболее легкий. Таким образом, для каждой исследованной особи может быть идентифицировано от 5 до 8 аллелей на все шесть локусов. Среднее же число аллелей на каждый локус равно четырем (вне зависимости от их полиморфности).

Следует также отметить, что все использованные локусы имели основной тетрамерный мотив, но только два из них (AoxD161 и AfuG113) в своем составе не содержали внутренних инсерций. Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

1. Доступные для исследования образцы тканей зеленого (сахалинского) осетра слишком малочисленны для того, чтобы оценить степень его полиморфности (и гетерозиготности).
2. Шести микросателлитных локусов достаточно, чтобы паспортизовать РМС сахалинского осетра в Охотском ЛРЗ.
3. В исследованной выборке среднее число аллелей на локус не превышает четырех, что не дает однозначного ответа о различиях в ploидности американского и сахалинского зеленых осетров.
4. Исследование митохондриального и ядерного геномов зеленого осетра должны быть продолжены с привлечением больших по объему выборок и параллельным анализом ДНК различными методами, поскольку на сегодняшний день достаточных оснований для разделения *A. medirostris* на два вида ни по митохондриальной, ни по ядерной ДНК нет.
5. Вне зависимости от видовой стратификации сахалинские осетры могут быть восстановлены с помощью организации генетического мониторинга и научно обоснованной эксплуатации создаваемого РМС через разработку индивидуальных генетических паспортов в сочетании с индивидуальным мечением. Только

это гарантирует научно обоснованный подбор производителей при получении потомства с минимальным инбридингом и максимальным генетическим разнообразием.