

<sup>1</sup> Биолого-почвенный институт  
Дальневосточного отделения РАН, Владивосток  
E-mail: chelomina@ibss.dvo.ru

<sup>2</sup> Хабаровский филиал Тихоокеанского  
научно-исследовательского  
рыбохозяйственного центра  
E-mail: amursturgeon@mail.ru

## ДИСКРИМИНАЦИЯ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ОСЕТРОВЫХ РЫБ АМУРА С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИЛОКУСНЫХ RAPD-PCR МАРКЕРОВ



Проведен RAPD-PCR анализ выборки амурских видов осетровых рыб (46 особей). Дана оценка генетического состояния аборигенных популяций амурского осетра *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 и калуги *Huso dauricus* (Georgi, 1775). Получены генетические свидетельства гибридного происхождения двух фенотипических гибридов. Оценки генетических дистанций между видами и гибридами оказались на уровне межвидовых. Показано, что для дискриминации видов наиболее эффективен точный тест на дифференциацию популяций (*Exact test*), а гибридов — многомерное шкалирование (*MDS*). Делается вывод, что популяции осетровых рыб р. Амур сохранили существенный уровень генетического разнообразия; наличие гибридов в них расценивается как один из факторов риска. Мультилокусные RAPD-PCR маркеры признаются удобным и надежным инструментом для проведения генетического мониторинга популяций амурских осетровых рыб с целью сохранения их генофонда.

**Введение.** Информация о структуре и функциях различных компонентов биоценоза на всех уровнях его организации, включая генетический, имеет огромное значение для мониторинга изучаемой системы, прогнозирования путей ее развития, разработки программ разумного использования биоресурсов. Выживание аборигенных видов/популяций зависит от сохранения исторически сложившегося характера их генетического разнообразия, в значительной мере чувствительного к интродукции в местах обитания гибридов родственных форм, а также конспецифичных видов из искусственно разводимых популяций.

Важным компонентом биоресурсов бассейна р. Амур являются осетровые рыбы — традиционный объект промысла и аквакультуры. Семейство осетровых рыб включает виды высокого экологического и экономического интереса, большинство из которых подвергаются риску сокращения численности или исчезновения. Поэтому в апреле 1998 г. все представители осетровых рыб были включены в конвенцию Международной торговли редкими видами (CITES, приложение II) [1–3]. Причины угрожаемого статуса разнообразны, они могут заключаться в чрезмерной рыбной ловле, загрязнении окружающей среды, межвидовой гибридизации и т. п., причем естественная межвидовая гибридизация у пресноводных рыб является более обычным событием, чем для других позвоночных [4], а рыбы из рыбоводных хозяйств часто попадают в природные водоемы [5].

Как и у большинства других представителей семейства, у амурских осетровых рыб, амурского осетра *Acipenser schrenckii* и калуги *Huso dauricus*, наблюдается снижение численности, и они подвергаются риску исчезновения. Основной причиной, определяющей современное состояние популяций этих видов, является чрезмерный вылов; негативное влияние также оказывает антропогенное загрязнение р. Амур. К числу возможных причин следует отнести естественную межвидовую гибридизацию. В последнее время возрастает угроза «разбавления» амурских популяций осетровых рыб их межвидовыми гибридами (отличающимися высоким коэффициентом выживаемости), искусственно получаемыми в рыбоводных хозяйствах КНР, которые выпускают их в р. Амур. При отсутствии должного контроля над этими

мероприятиями угроза для природных популяций может оказаться фатальной.

Молекулярно-генетические исследования амурских осетровых рыб, содержащихся в рыбноводном хозяйстве Лучегорской научно-исследовательской рыбноводной станции ТИНРО-Центра (п. Лучегорск Приморского края), показали, что RAPD-профили имеют достаточно выраженную видоспецифичность, причем при статистическом анализе хорошо идентифицируются межвидовые гибриды [6]. Метод RAPD-PCR анализа положительно зарекомендовал себя в популяционных исследованиях редких и массовых видов [7–11], а также при изучении естественных зон гибридизации во многих группах животных, включая рыб [12–17]. Одно из основных преимуществ метода заключается в том, что он позволяет одновременно анализировать множество независимых локусов и не требует предварительной информации о нуклеотидных последовательностях ДНК [18–20]. Поэтому в настоящей работе для генетической характеристики природных популяций осетровых рыб бассейна р. Амур и дискриминации их межвидовых гибридов мы сочли целесообразным использование мультилокусных RAPD-PCR маркеров.

Основная цель исследования – дать оценку генетического потенциала аборигенных популяций осетровых рыб бассейна р. Амур, необходимую для разработки программ по их сохранению и рациональному природопользованию. Конкретными задачами были оценка генетического разнообразия популяций амурского осетра и калуги, а также дискриминация межвидовых фенотипических гибридов с помощью мультилокусных RAPD-PCR маркеров.

**Материал и методы.** Материалом для исследования служили 46 осетров из природной популяции, включая 37 особей амурского осетра *Acipenser schrenckii*, 7 особей калуги *Huso dauricus* и 2 фенотипических гибрида. Фенотипически «чистые» особи были отловлены в ходе проведения научно-исследовательского лова в августе–сентябре 2005 г. в низовьях р. Амур (вблизи г. Николаевск-на-Амуре). Гибриды (по морфометрическим данным между калугой и амурским осетром) пойманы в конце октября 2005 г. в р. Амур в районе Хабаровска. Для сравнения в анализ были также включены по одному эк-

земпляру амурского осетра и калуги из Лучегорской рыбноводной станции ТИНРО-Центра (п. Лучегорск Приморского края).

Геномную ДНК получали из фиксированной этанолом печени стандартным фенольно-детергентным методом с последующей обработкой протеиназой К [21]. Концентрацию ДНК для PCR определяли электрофоретически в 1%-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере (0,04 М Трис-ацетат, 0,002 М ЭДТА), pH 7,8.

Полимеразную цепную реакцию проводили с десятичленными олигонуклеотидными праймерами производства «Сибэнзим», Россия (табл. 1), дающими четкие, хорошо идентифицируемые и воспроизводимые фрагменты ДНК. Реакцию амплификации осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 100 мМ Трис-HCl, pH 8,3, 500 мМ KCl, 2–3,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ dNTPs, 0,5 мМ праймера, 1 ед. Taq полимеразы (ГосНИИгенетика, Москва) и 30 нг матрицы ДНК. Для минимизации ошибки реакцию оптимизировали путем подбора необходимых концентраций каждого компонента и приготовлением общей смеси для всей выборки.

Реакцию PCR выполняли на термоциклере UNOII (Германия) в следующем температурном режиме: первоначальная денатурация при 94 °С 2 мин, 40 циклов, состоящих из четырех ступеней, включая 45 с при 92 °С, 30 с при 37 °С, 15 с при 45 °С и 2 мин при 72 °С. Реакцию завершала 10-минутная стадия элонгации при 72 °С. Негативный контроль реакции (тест на контаминацию) содержал реакционную смесь без добавления ДНК.

Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК проводили в 1,5%-ном агарозном геле в ТБЕ-буфере (0,89 М Трис, 0,089 М борной кислоты, 0,05 М ЭДТА), pH 7,8 с бромистым этидием (5 мкг/мл) и фотографировали в проходящем УФ. Размер каждого фрагмента определяли путем сравнения с маркерными фрагментами ДНК фага λ, гидролизованной эндонуклеазой PstI. В дальнейшем анализе использовали только те фрагменты, которые легко визуализировались и воспроизводились в повторных реакциях.

Статистический анализ RAPD-паттернов основывался на следующих допущениях: RAPD-фрагменты являются диплоидными доминантными маркерами (присутствующие ал-

лели амплифицированы, отсутствующие – не амплифицированы); комигрирующие фрагменты представляют собой гомологичные локусы с идентичной нуклеотидной последовательностью; локусы наследуются по законам Менделя; популяция находится в равновесии по Харди-Вайнбергу [20]. Для каждой особи присутствие фрагмента обозначалось как 1, отсутствие – 0.

Внутрипопуляционную генетическую изменчивость вычисляли по ряду параметров. Рассчитывали индексы внутривыборочной генетической изменчивости – доля полиморфных локусов без критерия ( $P$ ) и с 95%-ным критерием полиморфизма ( $P_{95}$ ), среднее ожидаемое ( $na$ ) и эффективное ( $ne$ ) число аллелей на локус, коэффициент гетерогенности выборки Шеннона-Вивера ( $I$ ) и теоретически ожидаемая гетерозиготность с поправкой на величину выборки ( $He_{un}$ ) [22].

Генетическую дифференциацию видовых выборок между собой и с фенотипическими гибридами оценивали по несмещенным генетическим дистанциям ( $Dun$ ), межпопуляционному генному разнообразию ( $Dst$ ), коэффициенту генных фиксации ( $Gst$ ), числу мигрантов на поколение ( $Nm$ ), и по точному тесту на дифференциацию популяций (Exact test) – аппроксимация точного теста (RxC) Монте-Карло на дифференциацию. Тест базируется на данных частот каждого локуса, включая  $\chi^2$ ,  $df$  и  $p$  [23]. Принимая, что каждый локус является независимым, тест Фишера применяли как глобальный тест на дифференциацию популяций по всем локусам [24].

Первичную обработку электрофоретических паттернов (получение бинарных матриц) проводили с использованием программы RFLPScan 3.12. Расчет генетических параметров осуществлен с помощью программ PopGen 32 [25], NTSYS [26] и TFGPA [27].

Реконструкции филогенетических связей выполнены посредством кластерного анализа невзвешенным попарно-групповым методом с арифметическим усреднением (UPGMA), методом ближайшего связывания (NJ) и построением минимального спеннинг-древа (MST) на основе попарных генетических дистанций Неи с использованием программ TreeConw [28], TFGPA [27] и NTSYS [26]. Многомерное шкалирование (MDS) выпол-

Таблица 1  
**Праймеры, использованные для RAPD-PCR анализа осетров**

Праймер	5'→3'
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-09	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-12	TCGGCGATAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-17	GACCGCTTGT
OPC-09	CTCACCGTCC
OPC-10	TGTCTGGGTG
OPD-05	TGAGCGGACA
OPF-06	GGGAATTCGG
OPF-08	GGGATATCGG
OPF-15	CCAGTACTCC

няли в программе NTSYS [26] для установления основных дивергентных групп.

**Результаты исследований.** *Изменчивость RAPD-спектров.* В общей выборке из 46 особей выявлено 173 фрагмента, которые рассматривались нами как аллели 173 локусов. Количество фрагментов ДНК для каждого праймера варьировало от 4 (OPA-11) до 22 (OPA-12), а их размер – в диапазоне 380–1600 пар нуклеотидов (п.н.). При визуальном анализе паттернов, полученные для видовых выборок, имели высокую степень сходства. Наилучшие картины межвидовой дифференциации были получены с помощью праймеров OPA-09, OPA-10, OPA-11 и OPA-17. Например, локус OPA-10<sub>320</sub> является специфичным для *A. schrenckii*, у *H. dauricus* он отсутствует, а локус OPA-10<sub>460</sub> имеет частотные отличия между сравниваемыми видами (рис. 1). Надежных маркеров (гибрид-специфичных фрагментов ДНК) для идентификации фенотипических гибридов осетровых рыб р. Амур выявлено не было.

*Генетическая изменчивость видов.* Выборки амурского осетра *A. schrenckii* и калуги *H. dauricus* оказались высокополиморфными ( $P = 71,1$  и  $P = 58,4$  % соответственно), а введение 95%-ного критерия существенно не повлияло на показатель полиморфизма амурского осетра (табл. 2), что свидетельствует о малочисленности редких аллелей у RAPD-локусов. Частотное распределение полиморф-

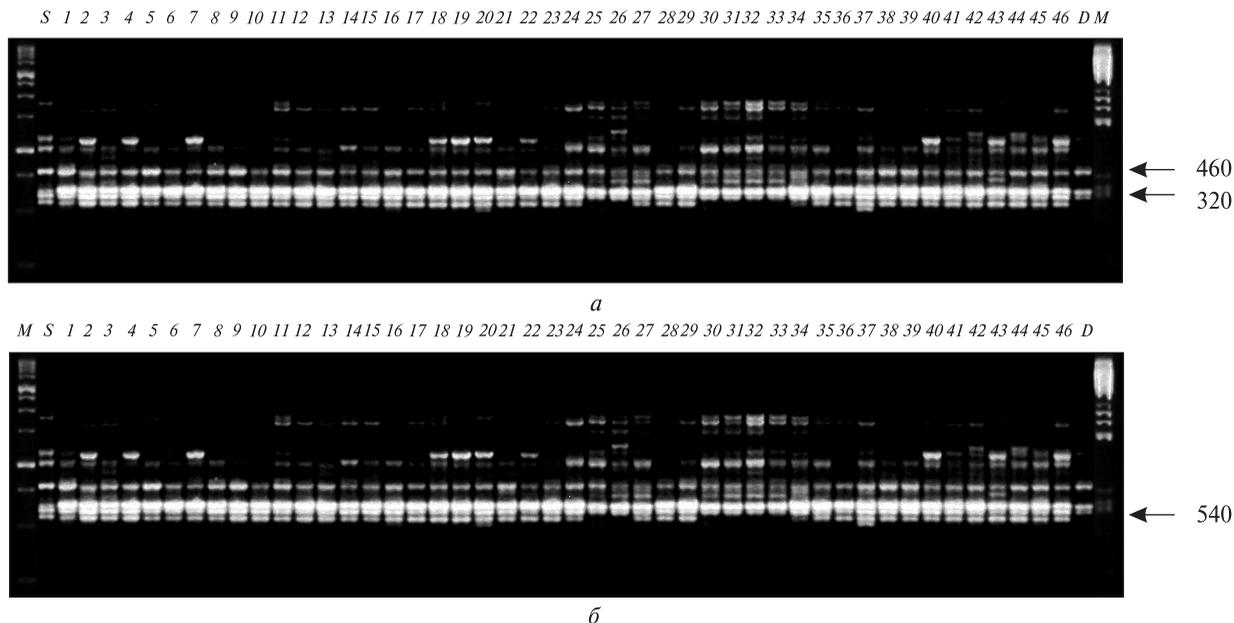


Рис. 1. RAPD-полиморфизм осетров, выявленный с помощью праймеров OPA-10 (а) и OPA-17 (б): S, 1–24, 28, 29, 36–46 – *Acipenser schrenckii*; 25–27, 30–33, D – *Huso dauricus*; 34, 35 – гибриды. Стрелками указаны маркерные фрагменты ДНК

Таблица 2  
Параметры генетической изменчивости амурского осетра и калуги

Выборка	<i>N</i>	<i>na</i>	<i>ne</i>	<i>I</i>	<i>P</i> , %	<i>P</i> <sub>95</sub> , %	<i>Hun</i>
<i>A. schrenckii</i>	165	1,71	1,58	0,38	71,1	65,9	0,26
<i>H. dauricus</i>	167	1,44	1,38	0,32	58,4		0,23

Примечание. *N* – число идентифицированных локусов; *na* – наблюдаемое число аллелей на локус; *ne* – эффективное число аллелей на локус; *I* – информационный индекс гетерогенности выборки Шеннона–Вивера; *P* – доля полиморфных локусов; *P*<sub>95</sub> – доля полиморфных локусов с 95%-ным критерием полиморфизма; *Hun* – несмещенная гетерозиготность.

ных локусов у сравниваемых видов имеет свои особенности. У амурского осетра большая часть (около 60 %) полиморфных локусов имеют среднюю частоту (0,2–0,7), около 30 % представлено низкочастотными локусами (частота ниже 0,2), а наименьшую долю (примерно 10 %) составляют высокочастотные локусы (частота более 0,7). У калуги локусов с высокой частотой не обнаружено (возможно, из-за малочисленности выборки), среднечастотные локусы составляют около 70 %,

а низкочастотные – около 30 %. Значения других параметров генетической изменчивости для каждой из видовых выборок также оказались достаточно высокими, например, *Hun* = 0,23 и 0,26, *I* = 0,32 и 0,38 (табл. 2).

**Дифференциация видовых выборок.** Все дифференцирующие показатели, за исключением точного теста, имели более высокие значения при сравнении видов с гибридами (табл. 3). Значения показателя межпопуляционного генного разнообразия (*Dst*) в проведенных сравнениях находились в пределах 0,04–0,06, следовательно, основная часть генетического разнообразия приходится на внутривидовую компоненту. Поэтому показатели генных фиксаций оказались невысокими (*Gst* = 0,15–0,28), а количество мигрантов на поколение между сравниваемыми популяционными выборками было слабо ограниченным (*Nm* = 1,3–2,9). Интерпретация значений *Nm*, вычисленных по RAPD-данным (т.е. непрямым путем), базируется на трех категориях: *Nm* < 1 (поток генов слишком мал, чтобы предотвратить генетическую дифференциацию, вызванную генетическим дрейфом), *Nm* = 1–5 (генный поток в зависимости от конкретных условий может быть

достаточным или нет, чтобы предотвратить эффект дрейфа),  $Nm > 5$  (генный поток достаточен, чтобы предотвратить генетическую дифференциацию, обусловленную дрейфом генов) [29]. Генетические дистанции между разными выборками варьировали в узких пределах ( $Dun = 0,10-0,13$ ). Точный тест на дифференциацию популяций (Exact test) признал генетически едиными объединенные выборки гибридов с каждым из родительских видов ( $p = 1$ ) и указал на отсутствие генетического единства объединенной выборки родительских видов ( $p = 0$ ) (табл. 3).

При анализе амурских осетровых рыб методом многомерного шкалирования (рис. 2) все особи, за исключением фенотипических гибридов, четко распределились в две группы. В одну группу вошли все экземпляры калуги, в другую — амурского осетра. Фенотипические гибриды расположились между калугой и амурским осетром.

**Филогенетические реконструкции.** Данные кластерного анализа, полученные методами NJ и UPGMA, в целом согласуются с данными многомерного шкалирования. На NJ-древе (рис. 3, а) выделяются два кластера. В первый вошли все особи амурского осетра, во второй — все экземпляры калуги. Фенотипические гибриды расположились в основании первого кластера. Исключив из анализа калугу, мы получили древо, где фенотипические гибриды занимают базальное положение (данные не приведены).

Дендрограмма UPGMA (рис. 3, б) отличается от NJ-древа тем, что на ней фенотипические гибриды кластеризуются в виде самостоятельной ветви кластера, сформированного калугой.

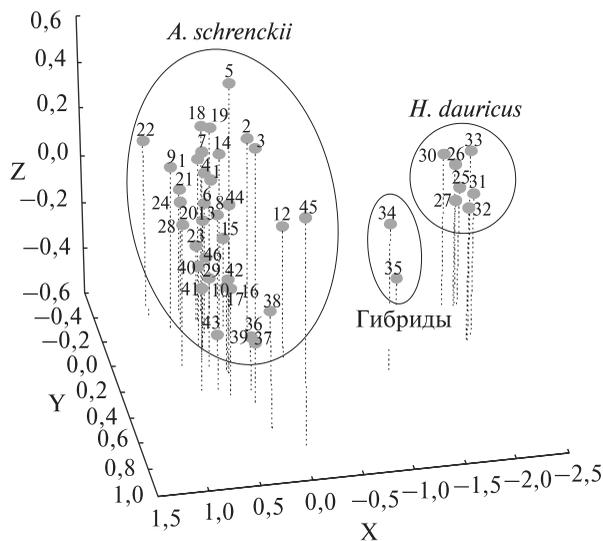


Рис. 2. Многомерный анализ генетического разнообразия осетров

MST демонстрирует четкую дифференциацию видов, которые соединяют фенотипические гибриды (рис. 3, в). Примечательно, что эта реконструкция указывает на гетерогенность популяции *A. schrenckii*, предполагая у него наличие по крайней мере двух генетически дискретных групп.

Во всех филогенетических реконструкциях особи амурского осетра и калуги из рыболовного хозяйства Лучегорский НИРС локализируются в соответствии с их видовой принадлежностью (данные не приведены).

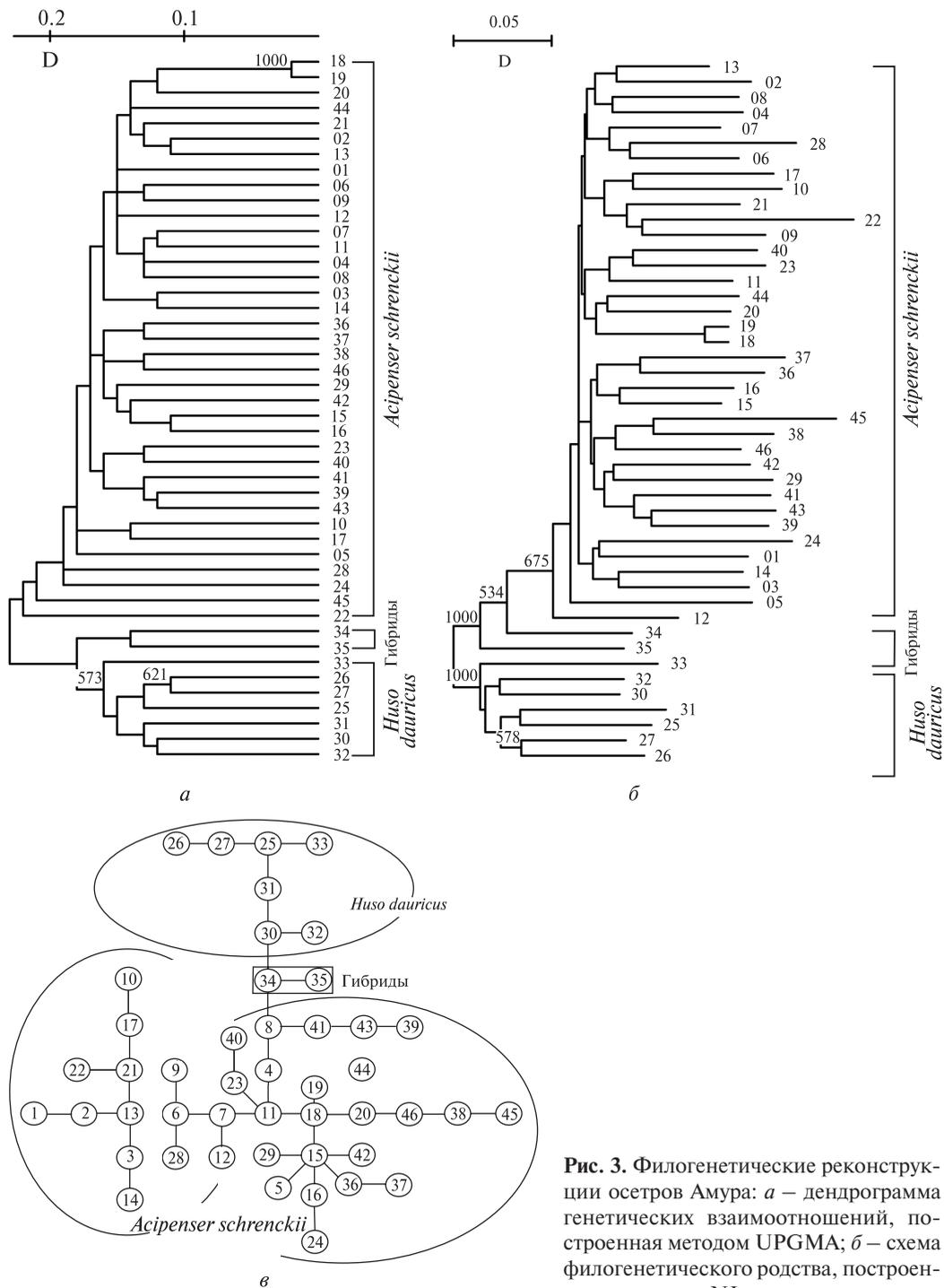
**Обсуждение полученных данных.** Исследование изменчивости RAPD-маркеров позволяет сделать вывод, что осетровые виды рыб бассейна р. Амур имеют достаточно высокий уровень

Генетическая дифференциация между видами и гибридами осетров

Таблица 3

Выборка	$Ht$	$Hs$	$Gst$	$Nm$	$Dun$	Exact test		
						$\chi^2$	$df$	$p$
<i>A. schrenckii</i> / <i>H. dauricus</i>	0,28	0,24	0,15	2,9	0,10	630,9	346	0,00
<i>A. schrenckii</i> / гибриды	0,23	0,17	0,26	1,4	0,13	168,1	346	1,00
<i>H. dauricus</i> / гибриды	0,21	0,15	0,28	1,3	0,12	99,9	346	1,00

Примечание.  $Ht$  — общее генетическое разнообразие популяции;  $Hs$  — генетическое разнообразие субпопуляции;  $Gst$  — коэффициент генных фиксаций;  $Nm$  — число мигрантов на поколение;  $Dun$  — несмещенные генетические дистанции Неи; Exact test — точный тест на дифференциацию популяций, где  $\chi^2$  — среднеквадратичное отклонение,  $df$  — число степеней свобод,  $p$  — вероятность генетической однородности.



**Рис. 3.** Филогенетические реконструкции осетров Амура: *а* – дендрограмма генетических взаимоотношений, построенная методом UPGMA; *б* – схема филогенетического родства, построенная методом NJ; *в* – минимальное спеннинг-дерево MST филогенетических связей. D – генетические дистанции. В узлах ветвления указаны бутстреп-индексы выше 50 % (в рамках 1000 репликаций)

генетического разнообразия. Расхождения в значениях основных популяционных параметров у амурского осетра и калуги (в пользу первого) прежде всего обусловлены разным размером выборки. Показатели генетического разнообразия осетровых рыб Амура сопоставимы с аналогичными показателями у массовых видов позвоночных [30, 31]. Маточное стадо амурских осетровых рыб Лучегорской НИРС генетически значительно уступает в разнообразии природным популяциям этих же видов [6]. Снижение генетического разнообразия в аквакультуре отмечено и для других видов рыб, например семги *Salmo salar* [32]. В некоторых случаях, таких как с кумжой *Salmo trutta*, напротив, наблюдалось увеличение показателей генетического разнообразия в искусственных популяциях [33]. Очевидно, что разный эффект при искусственном воспроизводстве зависит от условий скрещивания, которые могут вызывать либо инбридинг (как в первом примере), либо аутбридинг (как во втором) [34].

Высокие показатели генетического разнообразия популяционных выборок осетровых рыб р. Амур могут быть обусловлены некоторыми биологическими особенностями *Acipenseriformes*: большой срок жизни (до 60–80 лет), размножение не ежегодное, а с промежутками до пяти лет, позднее созревание (после 10–15 лет) иногда с существенной временной разницей между полами (в некоторых речных системах самцы созревают быстрее самок) [35–39]. Такие особенности ведут к генетическому «эффекту сохранения», который заключается в сохранении стабильного сосуществования видов в постоянно меняющейся среде [40]. Действительно, данные математического моделирования показали, что значительное перекрытие поколений среди долгоживущих видов может уменьшить эффект дрейфа генов в популяциях при прочих равных условиях [41]. Это может оказаться полезным для последующих попыток восстановления численности редких видов, в особенности, если искусственное разведение станет доминирующим [42].

Интересно, что нами не выявлено ни одного локуса, который отличал бы гибридов осетровых рыб из р. Амур от родительских видов. Гибрид-специфичные локусы (называемые «редкими аллелями», или «гибризимами») — об-

щий феномен для различных зон гибридизации растений и животных [43], хотя некоторые исследователи считают их появление артефактом [44]. У осетровых рыб, содержащихся на Лучегорской НИРС, нами выявлено >10 % таких локусов в генерации F<sub>1</sub> гибридов амурского осетра как с сибирским осетром, так и со стерлядью [6]. Гибрид-специфичные локусы обнаружены также у гибридов карповых рыб [45], озерной форели [46], европейского и американского видов осетров (*Acipenser naccarii* × *A. transmontanus*) [47]. Возможно, отсутствие гибрид-специфичных локусов у гибридов осетровых рыб р. Амур объясняется недостаточным количеством исследованных гибридных особей.

Куаттро с соавт. [42] отметили тот факт, что для видов с ограниченным распространением и/или физическими барьерами (что часто встречается у пресноводных видов) существенная доля генетического разнообразия может быть распределена между отдельными локациями в зависимости от времени, прошедшего с момента колонизации и изоляции. К такой категории видов принадлежат и осетровые рыбы. Среди ихтиологов существует мнение, что в р. Амур имеются четыре популяции амурского осетра, обитающие на определенных участках реки [36, 48]. И хотя исследованные нами образцы (за исключением гибридов) выловлены на одном и том же участке р. Амур, генетически они, как показали MST реконструкции (рис. 3, в), структурированы. Нельзя исключить, что в выборку попали представители разных пространственных группировок, совершающих в этот период на данном участке реки нерестовую миграцию. В любом случае генетическая подразделенность вида вообще и амурского осетра в частности повышает его шансы на выживание. Локальные адаптации уникальны и консервативны, их формирование происходит в ряду многих поколений под действием естественного отбора и среды, с которой связана естественная история популяций, поэтому их сохранение необходимо для выживания вида и сохранения его генофонда во всем многообразии [49].

Появление фенотипических гибридов (предположительно между *A. schrenckii* и *H. dauricus*) в природной популяции амурских осетров, вероятнее всего, является следствием искусствен-

ного воспроизводства, осуществляемого рыбодными заводами КНР. В аквакультуре этой страны отдается предпочтение гибридам ввиду их высокой по сравнению с родительскими видами продуктивности. Специалистами ТИНРО-Центра в 2005 и 2006 гг. зафиксированы факты выпуска в р. Амур с рыбодного завода в г. Фуюань (КНР) особей гибридного происхождения вместо «чистых» видов. В условиях очень низкой численности молоди естественного происхождения на данном участке Амура выпуск гибридной молоди крупного размера и отличающейся высокой выживаемостью, на наш взгляд, следует рассматривать как фактор риска для природных популяций осетровых рыб. Так, в 2005 г. среди 1802 разновозрастных экземпляров амурских осетровых рыб, отловленных в ходе научно-исследовательского лова, по морфологическим признакам были идентифицированы как гибриды 12 особей (в том числе 10 половозрелых), что в целом для бассейна Амура составляет 0,66 % особей. В то же время по результатам учета численности молоди на 60-километровом участке Амура возле Хабаровска доля гибридов в октябре 2005 г. составила 66,6 % (2 экземпляра из 3 пойманных). Известно, что ежегодно рыбы из рыбодных хозяйств проникают в нативные популяции конспецифичных или близкородственных видов. Например, в некоторых реках Норвегии число рыб фермерского происхождения превышает численность рыб из природных популяций [5]. Генетические последствия подобных инвазий могут быть самыми разнообразными. Искусственное разведение приводит к накоплению редких аллелей, которые неизбежно будут внесены в генофонд природных популяций, снизив тем самым общее генетическое разнообразие (так называемый эффект Раймана-Лайкре) [50]. К негативным генетическим эффектам можно отнести также гибридизацию со случайно интродуцированными особями, приводящую к разрушению локально адаптированных генных комплексов из-за аутбредной депрессии. В результате нарушается воспроизводство видовых генофондов, усиливаются деструктивные процессы в популяциях с нарушением исторически сложившегося оптимального для вида соотношения внутри- и межпопуляционной компонент

генного разнообразия, необходимых для поддержания структурированности вида [34, 51]. Хотя нами идентифицировано всего 2 гибрида из 46 исследованных природных особей осетров, что составляет около 4 % выборки, мы пока не можем дать корректную оценку уровня разбавления генофонда природных популяций осетровых рыб Амура их межвидовыми гибридами. Для этого (что ясно следует из ихтиологических наблюдений, см. выше) необходимо исследование популяционных выборок из разных участков реки. Однако сам факт обнаружения гибридных особей в условиях роста на территории КНР количества рыбодных хозяйств нельзя недооценивать, такая ситуация представляет реальную угрозу для реализации стратегии выживания аборигенных популяций осетровых видов рыб. В мировой практике этой проблеме уделяется большое внимание. Так, уже неоднократно обсуждался вопрос о реинтродукции искусственно полученных особей в природную среду в связи с необходимостью восстановления численности редких видов [52, 53], но, к сожалению, единого мнения так и не найдено [54–56]. Вместе с тем получены достоверные данные о том, что виды-интродуценты (в том числе случайные) в некоторых случаях могут полностью вытеснить аборигенные популяции [5, 57, 58]. Наши данные о генных потоках ( $Nm = 1-5$ ) свидетельствуют о том, что в зависимости от обстоятельств между сравниваемыми таксонами и гибридами могут преобладать дифференцирующие (дрейф генов) или интегрирующие (поток генов) процессы, и это обстоятельство можно рассматривать как повышающее фактор риска природных популяций осетровых рыб Амура.

Существует некоторая (по нашему мнению весьма небольшая) вероятность того, что обнаруженные нами гибриды имеют естественное происхождение; межвидовая и даже межродовая гибридизация между осетровыми рыбами происходит легко [2, 4]. Многолетние ихтиологические наблюдения на р. Амур свидетельствуют о постоянном присутствии гибридных особей в аборигенной популяции амурских осетровых рыб. Например, в работе Солдатова [59] приводится описание шести экземпляров гибридных особей амурского осетра и калуги,

отловленных в 1911–1913 гг. Поскольку в начале XX века искусственного разведения этих рыб еще не существовало, данный факт является доказательством постоянного наличия некоторого количества гибридов естественного происхождения в популяциях амурских осетровых рыб. Если это является биологической нормой данной популяции, то необходим ее генетический мониторинг, так как известно, что нарушение среды обитания (а бассейн р. Амур находится под постоянным антропогенным прессом) может привести к резкому увеличению межвидовой гибридизации (см., например, [60]).

Эффективность статистических методов в дискриминации межвидовых гибридов продемонстрирована в ряде исследований [14, 45, 47, 61 и др.]. Анализ полученных нами RAPD-данных с помощью разных статистических программ показал, что для различения видов амурских осетровых рыб, *A. schrenckii* и *H. dauricus*, наиболее эффективным является точный тест на дифференциацию популяций (Exact test), а их фенотипических гибридов – метод многомерного шкалирования MDS. Для выявления межвидовых гибридов амурского осетра с сибирским осетром и стерлядью, полученных искусственным путем, были эффективны эти же подходы, а также UPGMA и NJ реконструкции [6]. В настоящей работе высокая статистическая поддержка видовых кластеров получена только для NJ древа; в UPGMA реконструкциях она значительно ниже, особенно для *A. schrenckii*. Возможной причиной этому может быть наличие в исследуемой популяционной выборке отдаленных гибридов между осетровыми видами рыб. Поэтому для прояснения ситуации в дальнейшем мы планируем использовать также других молекулярных маркеров.

Таким образом, наши данные указывают на достаточно высокий уровень генетического разнообразия природных популяций амурского осетра *A. schrenckii* и калуги *H. dauricus*, что может быть свидетельством стабильного состояния видов. Популяция амурского осетра, вероятно, генетически структурирована, что повышает ее шансы на выживание. Однако популяция имеет биологический фактор риска – межвидовые гибриды. Интенсивный вылов рыбы, межвидовая гибридизация, экологи-

ческие загрязнения, а также инвазия искусственно разводимых рыб требует постоянного генетического мониторинга для сохранения генофонда аборигенных популяций осетровых рыб бассейна р. Амур (тем более что виды, являющиеся объектами промысла, имеют особую уязвимость и высокие шансы резко перейти в категорию исчезающих). Мультилокусные RAPD-PCR маркеры в сочетании со статистическими методами могут быть для этого удобным и надежным инструментом.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта ДВО РАН «Амурская экспедиция».

G.N. Chelomina, K.V. Rozhkovan,  
S.A. Ivanov

#### DISCRIMINATION OF INTERSPECIFIC HYBRIDS IN NATURAL POPULATIONS OF AMUR STURGEON FISHES USING MULTILOCUS RAPD-PCR MARKERS

RAPD-PCR analysis of 46 individuals of sturgeons from Amur River has been carried out. Genetic status of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 and kaluga *Huso dauricus* Georgi, 1775 native populations has been estimated. Genetic evidences of hybrid origin for two phenotypical hybrids were obtained; estimations of genetic distances between species and hybrids appeared to be at interspecific level. The exact test for differentiation of populations (Exact test) and multidimensional scaling (MDS) analysis were estimated to be the most effective for species and hybrid discrimination, respectively. According to data obtained populations of sturgeon fishes which inhabit Amur River maintained an essential level of genetic variability; the presence of hybrids is regarded as one of risk factors. Multilocus RAPD-PCR markers admit as the convenient and reliable tool for genetic monitoring of Amur River sturgeons to preserve their gene pool.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bemis W.E., Findeis E.K., Grande L. An overview of Acipenseriformes // Env. Biol. Fishes. – 1997. – 48. – P. 25–71.
2. Birstein V.J., Bemis W.E., Waldman J.R. The threatened status of acipenseriform species: a summary // Env. Biol. Fishes. – 1997. – 48. – P. 427–435.
3. Wei Q., Ke F., Zhang J. et al. Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China // Env. Biol. Fishes. – 1997. – 48. – P. 241–255.
4. Allendorf F.W., Waples R.S. Conservation and genetics of salmonid fishes // Conservation genetics (case histories from nature / Eds J.C. Avise, J.L. Hamrick. – New York : Chapman & Hall, 1996. – P. 238–280.
5. Heggberget T.G., Johnsen B.O., Hindar K. et al.

- Interactions between wild and cultured Atlantic salmon: A review of the Norwegian experience // *Fish. Res.* – 1993. – **18**. – P. 123–146.
6. Рожкован К.В., Челомина Г.Н., Рачек Е.И. Идентификация межвидовых гибридов осетровых рыб методом RAPD-PCR анализа // Молекулярная и прикладная генетика. Т. I / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2005. – С. 110.
  7. Cagigas M.E., Vazquez E., Blanco G., Sanchez J.A. Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites and RAPD markers // *Mar. Biotechnol.* – 1999. – **1**. – P. 286–296.
  8. Zhou L., Wang Y., Gui J.F. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch, based on detection of RAPD molecular markers // *Cytogenet. Cell Genet.* – 2000. – **88**. – P. 133–139.
  9. Shikano T., Taniguchi N. Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy *Poecilia reticulata* as a fish model // *Aquaculture.* – 2002. – **204**. – P. 271–281.
  10. Gouin N., Grandjean F., Bouchon D. et al. Population genetic structure of the endangered freshwater crayfish *Austroprotopambius pallipes*, assessed using RAPD markers // *Heredity.* – 2001. – **87**. – P. 80–87.
  11. Wasko A.P., Galetti Jr.P.M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species // *Hydrobiologia.* – 2002. – **474**. – P. 131–137.
  12. Hadrys H., Balick M., Schierwater B. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology // *Mol. Ecol.* – 1992. – **1**. – P. 55–63.
  13. Huang C.-F., Lin Y.-H., Chen J.-D. The use of RAPD markers to assess catfish hybridization // *Biod. Conserv.* – 2005. – **14**. – P. 3003–3014.
  14. Greef B.D., Triest L. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for hybrid detection in *Scirpus* from the river Schelde (Belgium) // *Mol. Ecol.* – 1999. – **8**. – P. 379–386.
  15. Esa Y.B., Waters J.M., Wallis G.P. Introgressive hybridization between *Galaxias depressiceps* and *Galaxias sp D* (Teleostei: Galaxiidae) on Otago, New Zealand: Secondary contact mediated by water races // *Cons. Genet.* – 2000. – **1**. – P. 329–339.
  16. Roques S., Sévigny J.-M., Bernatchez L. Evidence for broad scale introgressive hybridization between redfish (genus *Sebastes*) in the North-west Atlantic: a rare marine example // *Mol. Ecol.* – 2001. – **10**. – P. 149–165.
  17. Jug B.T., Dovic P., Pohar J., Snoj A. RAPD analysis as a tool for discriminating marble trout from hybrids (marble trout x brown trout) in the zones of hybridization // *J. Anim. Breed. Genet.* – 2004. – **121**. – P. 156–162.
  18. Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucl. Acids Res.* – 1990. – **18**. – P. 7213–7218.
  19. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak J.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids Res.* – 1990. – **18**. – P. 6531–6535.
  20. Grosberg R.K. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: a random primer for the novice and nervous // *Molecular Zoology* / Eds J.D. Ferraris, S.R. Palumbi. – New York: A John Wiley & Sons, Inc., 1996. – P. 67–100.
  21. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
  22. Nei M. Genetic distance between populations // *Amer. Natur.* – 1972. – **106**. – P. 385–398.
  23. Raymond M.L., Rousset F. An exact test for population differentiation // *Evolution.* – 1995. – **49**. – P. 1280–1283.
  24. Sokal R., Rolf F.J. *Biometry.* – New York: Freeman publ. Inc., 1995. – 887 p.
  25. Yeh F.C., Boyle T.B.J. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits // *Belg. J. Bot.* – 1997. – **129**. – P. 157.
  26. Rohlf J.F. Numerical taxonomy system of multivariable statistical programs (NTSYS-pc). 1992.
  27. Miller M.P. Tools for population genetics analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population data. 1997. Computer software distributed by author.
  28. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the constructions and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // *Comput. Appl. Biosci.* – 1994. – **10**. – P. 569–570.
  29. Gurdebeke S., Maelfait J.-P., Backeljau T. Contrasting allozyme and RAPD variation in spider populations from patchy forest habitats // *Genetica.* – 2003. – **119**. – P. 27–34.
  30. Спиридонова Л.Н., Челомина Г.Н., Стариков В.П. и др. RAPD-PCR анализ сусликов Тоболо-Ишимского междуречья: свидетельство межвидовой гибридизации большого *Spermophilus major* и красного *S. erythrognus* сусликов // *Генетика.* – 2005. – **41**. – С. 1210–1221.
  31. Атонкин Д.М., Богданов А.С., Челомина Г.Н. Генетическая изменчивость и дифференциация полевой мыши *Apodemus agrarius* // *Генетика.* – 2007. – **43**, № 6. – С. 804–817.
  32. Garcia-Marin J.L., Jorde P.E., Ryman N. et al. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery population of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain // *Aquaculture.* – 1991. – **77**. – P. 313–323.

33. *Stahl G.* Genetic population structure of Atlantic salmon // Population genetic and fishery management / Eds N. Ryman, F.M. Utter. — Seattle : Univ. Wash. press, 1987. — P. 121–140.
34. *Altukhov Yu.P., Salmenkova E.A.* Straying intensity and genetic differentiation in salmon populations // Aquaculture and Fish. Manag. — 1994. — 5. Suppl. 2. — P. 99–120.
35. *Крыхтин М.Л.* Темп полового созревания и ритм размножения калуги *Huso dauricus* (Georgi) лимана Амура // Вопр. ихтиологии. — 1986. — 26. — С. 945–954.
36. *Крыхтин М.Л., Горбач Э.И.* Осетровые рыбы Дальнего Востока // Экономическая жизнь Дальнего Востока. — 1994. — № 1 (3). — С. 86–91.
37. *Свицкий В.Г.* Амурский осетр и калуга (систематика, биология, перспективы воспроизводства) : Автореф.... канд. биол. наук. — Владивосток, 1967. — 32 с.
38. *Grunwald G., Stabile J., Waldman J.R., Gross R., Wirgin I.* Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences // Mol. Ecol. — 2002. — 11. — P. 1885–1898.
39. *Dadswell M.J., Taubert B.D., Squiers T.S., Marchette D., Buckley J.* Synopsis of biological data on shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, LeSueur 1818 // FAO Fisheries Synopsis. — 1984. — С. 140.
40. *Cáceres C.E.* Temporal variation, dormancy, and coexistence : A field test of the storage effect // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1997. — 94. — P. 9171–9175.
41. *Gaggiotti O.E., Vetter R.D.* Effect of life-history strategy, environmental variability, and overexploitation on the genetic diversity of pelagic fish populations // Can. J. Fish. Aquat. Sci. — 1999. — 56. — P. 1376–1388.
42. *Quattro J.M., Jones W.J., Rohde F.C.* Evolutionarily significant units of rare pygmy sunfishes (Genus *Elassoma*) // Copeia. — 2001. — 101. — P. 514–520.
43. *Harrison R.G.* Hybrid zones and evolutionary process. Oxford : Univ. Press, 1993.
44. *Riedy M.F., Hamilton W.J., Aquadro C.F.* Excess of non-parental bands in offspring from primal pedigrees assayed using RAPD-PCR // Nucl. Acids Res. — 1992. — 20. — P. 918.
45. *Хрисанфова Г.Г., Луданный Р.И., Слынько Ю.В. и др.* RAPD фингерпринт леща (*Abramis brama* L.), плотвы (*Rutilus rutilus* L.) и гибридов первого поколения лещ × плотва и плотва × лещ // Генетика. — 2004. — 40. — С. 1432–1436.
46. *Scott W., Ihssen P.E., White B.N.* Inheritance of RAPD molecular markers in lake trout *Salvelinus namaycush* // Mol. Ecol. — 1997. — 6. — P. 606–613.
47. *Congiu L., Dupanloup I., Patarnello T. et al.* Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon // Mol. Ecol. — 2001. — 10. — P. 2355–2359.
48. *Krykhtin M.L., Svirskii V.G.* Endemic sturgeon of the Amur river: kaluga, *Huso dauricus* and Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* // Environ. Biol. Fish. — 1997. — 48. — P. 231–239.
49. *Waples R.S., Gustafson R.J., Weitkamp L.A. et al.* Characterizing diversity in salmon from the Pacific Northwest // J. Fish Biol. — 2001. — 59. — P. 1–41.
50. *Ryman N., Laikre L.* Effects of supportive breeding on the genetically effective population size // Cons. Biol. — 1991. — 5. — P. 325–329.
51. *Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т.* Популяционная генетика лососевых рыб. — М.: Наука, 1997. — 288 с.
52. *Binkowski F.P., Doroshov S.I.* North American Sturgeons : Biology and Aquaculture Potential. — Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, 1985.
53. *Waldman J.R., Wirgin I.* Status and restoration options for Atlantic sturgeon in North America // Cons. Biol. — 1998. — 12. — P. 631–638.
54. *Stockwell C.A., Mulvey M., Vinyard G.L.* Translocations and the preservation of allelic diversity // Cons. Biol. — 1996. — 10. — P. 1133–1141.
55. *Utter F.* Genetic problems of hatchery-reared progeny released into the wild, and how to deal with them // Bull. Mar Sci. — 1998. — 62. — P. 623–640.
56. *Waples R.S.* Dispelling some myths about hatcheries // Fisheries. — 1999. — 24. — P. 12–16.
57. *Панов Е.Н.* Гибридизация и экологическая изоляция у птиц. — М.: Наука, 1989. — 509 с.
58. *Altukhov Yu.P., Salmenkova E.A., Omelchenko V.T.* Salmonid fishes : Population biology, genetics and management. — Oxford : Blackwell, 2000. — 354 p.
59. *Солдатов В.К.* Исследование осетровых Амура // Материалы к познанию русского рыболовства. — 1915. — 3, вып. 12. — 415 с.
60. *Шварц С.С.* Экологические закономерности эволюции. — М.: Наука, 1980. — 278 с.
61. *Цвирка М.В., Челомина Г.Н., Кораблев В.П.* Генетические свидетельства гибридизации между бледнохвостым *Spermophilus pallidicayda* Satunin, 1903 и алашанским *S. alashanicus* Buchner, 1888 сусликами в Монголии // Генетика. — 2006. — 42. — С. 530–537.

Поступила 01.04.07