

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЕСТЕСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ СТЕРЛЯДИ (*Acipenser ruthenus* L.) В БАССЕЙНАХ РЕК КАМА И ОБЬ НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ISSR МАРКЕРОВ

Л.В. КОМАРОВА^{1, 2}, Н.В. КОСТИЦЫНА¹, С.В. БОРОННИКОВА¹,
А.Г. МЕЛЬНИКОВА²

Стерлядь (*Acipenser ruthenus* L.) включена в Красные книги Российской Федерации, Пермского края и Кировской области. Ввиду необходимости охраны промысловых и исчезающих рыб особенно важны исследования популяций, претерпевающих антропогенные нагрузки. Один из методов изучения генетического разнообразия популяций растений и животных — межмикросателлитный анализ полиморфизма ДНК (inter simple sequence repeats, ISSR). Изучение генетической структуры популяций стерляди в бассейнах рек Камы и Оби с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК ранее не проводилось. Целью нашего исследования был анализ генетического разнообразия и структуры естественных популяций стерляди из Кировской области, Пермского края и Ханты-Мансийского автономного округа на основании полиморфизма ISSR маркеров. Объектом исследований были естественные популяции стерляди в возрасте 3-4 лет. Отбор проб проводили в 2015-2016 годах у 195 особей из рек Кама, Обь и Вятка. Материалом для экстракции ДНК служили фрагменты грудных плавников рыб, зафиксированных в спирте. Пробы ДНК были проанализированы с пятью эффективными ISSR-праймерами. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ POPGENE 1.31 и GenAlEx6. Определяли долю (P_{95}) полиморфных локусов, а также ожидаемую (H_e) гетерозиготность, абсолютное (N_a) и эффективное число аллелей (N_e), число редких аллелей (R). Байесовский анализ структуры популяции выполняли с использованием пакета STRUCTURE 2.3.4. Для описания генетической структуры популяции были использованы ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) во всей популяции, ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_S) в субпопуляции и показатель подразделенности популяций (G_{ST}). Выявлено 128 ISSR-PCR маркеров. В зависимости от ISSR-праймера число амплифицированных ISSR-PCR маркеров варьировало от 7 до 23. Доля полиморфных локусов *A. ruthenus* в общей выборке была высока — 0,938. Наибольшие показатели генетического разнообразия обнаружены в популяции стерляди из реки Вятка ($P_{95} = 0,876$; $H_e = 0,232$; $N_e = 1,402$; $R = 10$), а наименьшие — в популяции из реки Обь ($P_{95} = 0,634$; $H_e = 0,100$; $N_e = 1,175$; $R = 3$). В общей выборке выявили 23 редких ISSR-PCR маркера, причем 10 из них — в популяции из реки Вятка, что указывает на возможность успешной идентификации стерляди этой популяции. Величина H_T составила 0,283, H_S оказалась значительно ниже — 0,173, поэтому показатель G_{ST} был высок и составил 0,386. Изученные популяции стерляди были сильно дифференцированы: на межпопуляционную компоненту приходилось 38,6 % генетического разнообразия, на внутривидовую — 61,4 %. Показана эффективность межмикросателлитного анализа ДНК для идентификации стерляди на популяционном уровне. Установлено, что ISSR-PCR маркеры могут быть использованы как для характеристики генофондов, так и для молекулярно-генетической идентификации популяций и пород, включая популяции и ремонтно-маточные стада. Даны рекомендации по сохранению генофондов естественных популяций *A. ruthenus* в бассейнах рек Кама и Обь. Данные о генетическом разнообразии естественных популяций стерляди необходимо использовать при формировании ремонтно-маточных стад для искусственного воспроизводства стерляди с дальнейшим выпуском молоди в популяцию с идентичным генофондом.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, генофонд, генетическая структура, ISSR-PCR маркеры, молекулярно-генетическая идентификация, *Acipenser ruthenus* L., осетровые.

Изучение полиморфизма молекулярно-генетических маркеров — обязательный этап разработки программ по сохранению генетических ресурсов осетровых рыб. Анализ генофондов с использованием молекулярно-генетических маркеров свидетельствует о выраженных особенностях генетической структуры и необходимости дальнейшей разработки генетически обоснованных методов сохранения биоразнообразия редких видов рыб (1).

Один из методов для изучения генетического разнообразия популяций растений и животных — межмикросателлитный анализ полиморфизма ДНК (inter simple sequence repeats, ISSR). Он обладает хорошей воспроизводимостью и с успехом применяется в мировой (2, 3) и отечественной прак-

тике (4). ISSR-метод может быть использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации видов, популяций, линий, а в ряде случаев — для индивидуального генотипирования (5). Установлено, что ISSR маркеры имеют выраженные пороодо- и видоспецифические особенности (6). В работах Ю.А. Столповского с соавт. (7-9), L.V. Nesteruk с соавт. (10), P.P. Srivastava с соавт. (11) ISSR-метод применялся для генотипирования популяций и пород животных, в том числе идентификации популяций тутового шелкопряда (12). В связи с этим перспективно проанализировать использование полилокусного маркирования для молекулярно-генетической идентификации популяций и стад стерляди.

Осетроводство в России с каждым годом приобретает все больший масштаб как одна из важнейших отраслей сельского хозяйства. Искусственное воспроизводство позволяет компенсировать ущербы водным биоресурсам и проводить мероприятия по реинтродукции осетровых (13). Стерлядь (*Acipenser ruthenus* L.) — один из наиболее широко распространенных представителей осетровых в России с длительной эволюционной историей (14). Отдельные популяции этого вида включены в Красную книгу Российской Федерации (15), Пермского края (16) и Кировской области (17). Коммерческая ценность осетровых стимулирует интенсивный вылов этих рыб. Строительство гидротехнических сооружений и расположение промышленных зон вблизи водных объектов привело к резкому снижению численности естественных популяций стерляди (18). Для ее восполнения и компенсации ущерба, нанесенного хозяйственной деятельностью человека, в естественную среду выпускают особей, выращенных в рыбоводных хозяйствах. На сегодняшний день нет сведений об эффективности подобных мероприятий, поскольку отсутствует одна из важнейших составляющих природоохранных реакклиматизационных мероприятий — данные о восполнении популяций. Для учета возврата в популяции особей, выращенных в рыбоводных хозяйствах, необходимы исследования, включающие идентификацию молоди из хозяйств, а также особей, принадлежащих к природной популяции в исследуемом водоеме (19). Ввиду необходимости охраны промысловых и исчезающих рыб особенно важны исследования популяций, претерпевающих антропогенные нагрузки (20). Изучение генетической структуры популяций стерляди в бассейнах рек Камы и Оби с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК ранее не проводилось.

Нами с помощью межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК впервые получены данные о структуре популяции стерляди из рек Кама, Обь и Вятка. Выявлены редкие ISSR маркеры и предложены два подхода к идентификации популяций стерляди — по уникальным маркерам и сочетанию полиморфных маркеров.

Цель работы — изучение генетического разнообразия естественных популяций стерляди на основании полиморфизма ISSR маркеров.

Методика. Объектом исследований были естественные популяции стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) в возрасте 3-4 лет. Отбор проб провели в 2015-2016 годах у 195 особей, выловленных в пяти точках: Vi — река Вятка около н.п. Вишкиль (среднее течение), Sh — река Вятка около н.п. Шурма (нижнее течение, 236 км от выборки Vi по течению реки), Vp — река Вятка в районе г. Вятские поляны Кировской области (нижнее течение, 138 км от выборки Sh по течению реки), Km — река Кама ниже плотины Воткинской ГЭС, СНМ — река Обь в районе слияния рек Иртыш и Обь.

Фрагменты плавников собирали прижизненно, затем особей возвращали в водоем. Плавники фиксировали в 96 % спирте. Выделение тотальной ДНК из навески массой 100 мг осуществляли по методике S.O. Rogers

(21). Качество и концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific», США) и доводили до 10 нг/мкл.

Межмикросателлитный анализ полиморфизма ДНК проводили согласно описанию (5). ПЦР (polymerase chain reaction, PCR) проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 2 ед. Tag ДНК-полимеразы, 2,5 мкл стандартного 10× буфера для ПЦР, 25 пМ праймера, 2,5 мМ Mg^{2+} , 0,25 мМ dNTPs, 5 мкл тотальной ДНК. Пробы ДНК рыб были проанализированы с пятью эффективными для стерляди ISSR-праймерами, подобранными ранее (22). ПЦР осуществляли в амплификаторе GeneAmp Biosystem («Applied Biosystems», США) в обычном для ISSR-метода режиме: предварительная денатурация 2 мин при 94 °С; денатурация 20 с при 94 °С, отжиг праймера 10 с при 56 °С, элонгация 10 с при 72 °С (5 циклов); денатурация 5 с при 94 °С, отжиг праймера 5 с при 56 °С, элонгация 5 с при 72 °С (30 циклов); заключительная элонгация 2 мин при 72 °С. Температура отжига в зависимости от G/C-состава праймеров варьировала от 56 до 64 °С. В качестве отрицательного (К-) контроля в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов вместо ДНК добавляли 5 мкл деионизированной воды. Для доказательства воспроизводимости результатов ПЦР-анализ повторяли трижды. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,7 % агарозном геле с 1× TBE буфером. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp + 1,5 + 3 Kb DNA Ladder, «ООО-СибЭнзим-М», Москва). Длину фрагментов определяли с использованием программы Quantity One в системе гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США).

Компьютерный анализ полученных данных проводили в программе POPGENE 1.31 (23) и с помощью специализированного макроса GenAlEx6 (24) для Microsoft Excel с определением доли полиморфных локусов (P_{95}), а также ожидаемой (H_e) гетерозиготности, среднего числа аллелей (N_a) и эффективного числа аллелей (N_e) на locus, числа редких аллелей (R).

Для описания генетической структуры популяции использовали следующие параметры (25, 26): ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) во всей популяции как мера общего генного разнообразия; ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_S) в субпопуляции как мера внутрипопуляционного разнообразия; доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии, или показатель подразделенности популяций (G_{ST}). Байесовский метод анализа популяционной структуры выполняли с использованием пакета STRUCTURE 2.3.4. Оценку надежности возможных кластерных групп и их визуализацию осуществляли в программе STRUCTURE HARVESTER (27). Структуру популяции рассчитывали посредством размещения исследуемых особей в наиболее вероятное число кластеров согласно алгоритму, предложенному G. Evanno с соавт. (28). Вероятность числа кластеров определяли в диапазоне от 1 до 10.

Результаты. В пяти выборках из естественных популяций стерляди обнаружили и проанализировали 128 ISSR-PCR маркеров, из которых 120 оказались полиморфными ($P_{95} = 0,938$). Число амплифицированных ISSR-PCR маркеров варьировало в зависимости от праймера от 7 (праймер CR-212) до 23 (праймер X9). Наибольшую долю полиморфных локусов выявили в выборке Vp ($P_{95} = 0,876$), наименьшую — в СНМ ($P_{95} = 0,634$). Ожидаемая гетерозиготность (H_e) для общей выборки оказалась невысока и составила 0,173 (табл. 1). В выборке Vp ожидаемая гетерозиготность оказалась наибольшей ($H_e = 0,232$), в СНМ — наименьшей ($H_e = 0,100$). Можно предположить, что высокая ожидаемая гетерозиготности в попу-

ляции Vp связаны с систематическими выпусками молоди из ближайших рыбоводных хозяйств, в основу маточных стад которых вошли особи естественных популяций реки Вятка. Для успешной идентификации принадлежности стерляди к конкретной популяции или установления ее географического происхождения важно наличие уникальных ISSR-PCR маркеров (R), которые присутствуют только в одной из популяций. В общей выборке естественных популяций было выявлено 23 уникальных ISSR-PCR маркера, причем 10 обнаружили в выборке Vp, что свидетельствует о возможности успешной идентификации стерляди этой популяции.

1. Генетическое разнообразие изученных выборок из естественных популяций стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) (2015-2016 годы)

Популяция	P ₉₅	H _e	Na	Ne	R
Vp	0,876	0,232 (0,018)	1,625 (0,486)	1,402 (0,381)	10
Km	0,768	0,162 (0,018)	1,476 (0,501)	1,282 (0,374)	5
СНМ	0,634	0,100 (0,016)	1,258 (0,439)	1,175 (0,328)	3
Vi	0,835	0,198 (0,017)	1,625 (0,486)	1,325 (0,344)	5
Sh	0,805	0,174 (0,017)	1,523 (0,501)	1,295 (0,364)	0
Всего	0,938	0,173 (0,110)	2,000 (0,000)	1,468 (0,340)	23

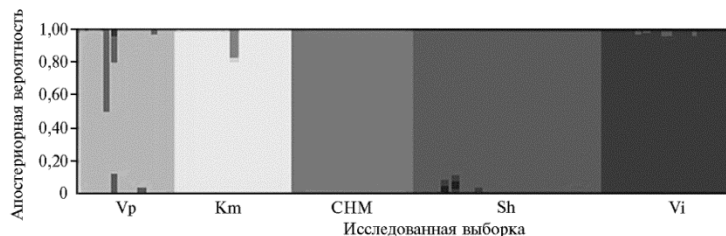
Примечание. P₉₅ — доля полиморфных локусов, H_e — ожидаемая гетерозиготность, Na — абсолютное число аллелей на локус, Ne — эффективное число аллелей на локус, R — число уникальных ISSR-PCR маркеров. Показатели статистически значимы при P ≤ 0,05; в скобках даны стандартные отклонения (SD). Описание популяций см. в разделе «Методика».

Анализ генетической структуры и дифференциации изученных популяций стерляди показал (табл. 2), что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) на общую выборку составила 0,283. Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции (H_S) была равна 0,173. Следовательно, в среднем в каждой популяции присутствовало 17 % гетерозигот. Показатель подразделенности популяций (G_{ST}) составил 0,386, то есть на межпопуляционную компоненту генетического разнообразия стерляди приходилось 38,6 % разнообразия, на внутривидовую — 61,4 %. Изученные выборки стерляди были сильно дифференцированы.

2. Характеристика генетической структуры и дифференциации изученных популяций стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) из рек Кама, Обь и Вятка (2015-2016 годы)

ISSR-праймер	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	H _T	H _S	G _{ST}
CR-212	(CT) ₈ TG	0,302 (0,028)	0,225 (0,017)	0,252
CR-215	(CA) ₆ GT	0,314 (0,033)	0,159 (0,085)	0,492
ISSR-9	(ACG) ₇ G	0,220 (0,022)	0,159 (0,012)	0,277
X9	(ACC) ₆ G	0,277 (0,022)	0,155 (0,008)	0,442
X11	(AGC) ₆ G	0,312 (0,022)	0,182 (0,009)	0,417
На общую выборку		0,283 (0,026)	0,173 (0,011)	0,386

Примечание. H_T — ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в общей выборке, H_S — ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции, G_{ST} — доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии, или показатель подразделенности популяций. Показатели статистически значимы при P ≤ 0,05; в скобках даны стандартные отклонения (SD).



Структура распределения генотипов стерляди (*Acipenser ruthenus* L.) из рек Кама, Обь и Вятка (при K = 5) (2015-2016 годы). Программа STRUCTURE. Описание популяций см. в разделе «Методика».

Было выявлено пять генетически обособленных групп. Для каждой из 195 исследованных особей в выборке определили вероятность ее принадлежности к какому-либо из предложенных кластеров (рис.).

Выявленные нами ISSR-PCR маркеры стабильны и воспроизводи-

лись при повторных ПЦР. Нами предложены два подхода к идентификации популяций стерляди — по уникальным маркерам и на основании сочетания полиморфных маркеров. Первый подход иллюстрирует пример выборки Vi с уникальным ISSR-PCR маркером Ac_{уп}780_{X9} (длина 780 п.н.), который амплифицировался с праймером (ACC)₆G (обозначен X9) и присутствовал только в Vi с частотой 0,660. На принадлежность к популяции Km указывало наличие одновременно двух полиморфных маркеров — Ac_p640_{CR-212} (длина 640 п.н., частота 0,706), амплифицированного с праймера (CT)₈TG, и Ac_p520_{X9} (520 п.н., частота 0,735), выявляемого с праймером (ACC)₆G.

Ранее ISSR-PCR маркеры были использованы (29) для контроля генетической структуры сельскохозяйственных видов млекопитающих и выявления породоспецифических особенностей их генофондов. Микросателлитные локусы (simple sequence repeats, SSR) применяли для установления видовой принадлежности осетровых и выявления особей гибридного происхождения рыб (30). В представленной работе мы показали, что межмикросателлитный анализ ДНК (ISSR-PCR маркеры) эффективен при изучении генетической структуры и молекулярно-генетической идентификации популяций стерляди, что необходимо для формирования ремонтно-маточных стад, в которых происходит искусственное воспроизводство стерляди с дальнейшим выпуском молоди в популяцию с идентичным генофондом. Для таких стад рекомендуется популяция *A. ruthenus* из реки Вятки Vp с высоким генетическим разнообразием. При идентификации принадлежности стерляди к конкретной популяции или установления ее географического происхождения на основании выявленных молекулярных маркеров, включая редкие ISSR-PCR маркеры, следует составлять молекулярно-генетические формулы, штрихкоды и генетические паспорта.

Таким образом, в изученных популяциях *Acipenser ruthenus* в бассейнах рек Кама и Обь выявлено 128 ISSR-PCR маркеров. Установлена высокая доля (0,938) полиморфных локусов в общей выборке. Выборка из реки Вятка в районе г. Вятские имела наибольшие показатели генетического разнообразия ($P_{95} = 0,876$; $H_e = 0,232$; $N_e = 1,402$; $R = 10$) относительно выборок, взятых из той же реки ближе к ее истоку. Выборку из реки Обь можно охарактеризовать как популяцию с низким генетическим разнообразием ($P_{95} = 0,634$; $H_e = 0,100$; $N_e = 1,175$; $R = 3$). Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) на общую выборку составила 0,283, в отдельной популяции этот показатель (H_S) был значительно ниже — 0,173. Следовательно, на межпопуляционную компоненту генетического разнообразия стерляди приходилось 38,6 %, на внутривидовую — 61,4 %. Изученные популяции оказались сильно дифференцированы. В каждой выборке *A. ruthenus* определены уникальные молекулярные маркеры, а также сочетания полиморфных маркеров, которые могут быть использованы для молекулярно-генетической идентификации изученных популяций стерляди.

ЛИТЕРАТУРА

1. Харченко П.Н., Глазко В.И. *ДНК-технологии в развитии агробиологии*. М., 2006.
2. Chen Y., Peng Z., Wu C., Ma Z., Ding G., Cao G., Ruan S., Lin S. Genetic diversity and variation of Chinese fir from Fujian province and Taiwan, China, based on ISSR markers. *PLoS ONE*, 2017, 12(4): e0175571 (doi: 10.1371/journal.pone.0175571).
3. Wazid H., Surendra Nath B. Genetic characterization of microsporidians infection Indian non-mulberry silkworms (*Antheraea assamensis* and *Samia cynthia ricini*) by using PCR based ISSR and RAPD marker assay. *Int. J. Indust. Entomol.*, 2015, 30(1): 6-16.
4. Мельникова М.Н., Сенчукова С.Д., Павлов С.Д. Разработка новых популяционно-гене-

- тических маркеров для вида *Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* на основе варибельности межсателлитной ДНК. *Доклады академии наук*, 2010, 435(1): 138-141.
5. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
 6. Глазко В.И., Феофилов А.В., Бардуков Н.В., Глазко Т.Т. Видоспецифические ISSR-PCR маркеры и пути их формирования. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 2012, 1: 18-125.
 7. Столповский Ю.А. Популяционно-генетические основы сохранения генофондов domesticiрованных видов животных. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2013, 17(4/2): 900-915.
 8. Столповский Ю.А., Лазебный О.Е., Столповский К.Ю., Сулимова Г.Е. Применение метода оценки популяционной структуры идентификации и сходства генофондов пород и видов domesticiрованных животных. *Генетика*, 2010, 46(6): 1-9.
 9. Столповский Ю.А., Кол Н.В., Евсюков А.Н., Нестерук Л.В., Доржа Ч.М., Цендсүрэн Ц., Сулимова Г.Е. Сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров в популяциях яка (*Bos mutus*) и гибридов F₁ между яком и крупным рогатым скотом в Саяно-Алтайском регионе. *Генетика*, 2014, 50(10): 1163-1176 (doi: 10.7868/S0016675814100142).
 10. Nesteruk L.V., Makarova N.N., Evsyukov A.N., Svishcheva G.R., Lhasaranov B.B., Stolpovsky Yu.A. Comparative estimate of the sheep breed gene pools using ISSR-analysis. *Russian Journal of Genetics*, 2016, 52(3): 304-313 (doi: 10.1134/S102279541603011X).
 11. Srivastava P.P., Kar P.K., Awasthi A.K., Raje Urs S. Identification and association of ISSR markers for thermal stress in polyvoltine silkworm *Bombyx mori*. *Russian Journal of Genetics*, 2007, 43(8): 858-864 (doi: 10.1134/S1022795407080042).
 12. Bhuvaneswari G., Surendra Nath B. Molecular characterization and phylogenetic relationships of seven microsporidian isolates from different Lepidopteran pests cross infecting silkworm *Bombyx mori* based on intergenic spacer sequence analysis. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2015, 3(2): 324-330.
 13. Базельюк Н.Н., Козлова Н.В., Мухамедова Р.М. Молекулярно-генетическая идентификация русского осетра (*Acipenser queldenstaedtii*) из естественных популяций Волжско-Каспийского бассейна. *Естественные науки*, 2013, 2: 82-86.
 14. Kovalchuk O.M., Hilton E.J. Neogene and Pleistocene sturgeon (*Acipenseriformes, Acipenseridae*) remains from southeastern Europe. *J. Vertebr. Paleontol.*, 2017, 37(5): e1362644 (doi: 10.1080/02724634.2017.1362644).
 15. *Красная книга Российской Федерации. Животные*. М., 2001.
 16. *Красная книга Пермского края* /Под ред. А.И. Шепеля. Пермь, 2008.
 17. *Красная книга Кировской области. Животные, растения, грибы*. Екатеринбург, 2001.
 18. Тимошкина Н.Н., Водолажский Д.И., Усатов А.В. Молекулярно-генетические маркеры в исследовании внутри- и межвидового полиморфизма осетровых рыб (*Acipenseriformes*). *Экологическая генетика*, 2010, 8: 12-24.
 19. Fopp-Bayat D., Kuzniar P., Kolman R., Liszewski T., Kucinski M. Genetic analysis of six sterlet (*Acipenser ruthenus*) populations — recommendations for the plan of restitution in the Dniester River. *Iran. J. Fish. Sci.*, 2015, 14(3): 634-645.
 20. Адрианов А.В. Современные проблемы изучения морского биологического разнообразия. *Биология моря*, 2004, 30(1): 3-19.
 21. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.*, 1985, 5: 69-76.
 22. Комарова Л.В., Костицына Н.В., Боронникова С.В. Подбор ISSR-праймеров для молекулярно-генетического анализа стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus). *Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Тенденции инновационных процессов в науке»*. М., 2015, ч. 1: 6-8.
 23. Yeh F.C., Mao J., Young R.C. *POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits*. Alta, Department of Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, 1999.
 24. Peakall R., Smouse P.E. GenA1Ex6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, 2006, 6: 288-295.
 25. Nei M. *Molecular population genetics and evolution*. Amsterdam, 1975.
 26. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms restriction endonucleases. *PNAS USA*, 1979, 76: 5269-5273 (doi: 10.1073/pnas.76.10.5269).
 27. Earl D.A., Vonholdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.*, 2012, 4(2): 359-361 (doi: 10.1007/s12686-011-9548-7).
 28. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.*, 2005, 14(8): 2611-2620 (doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x).
 29. Glazko V.I., Gladys' E.A., Feofilov A.V., Bardukov N.V., Glazko T.T. ISSR-PCR and mobile genetic elements in genomes of farm mammalian species. *Agricultural Biology*, 2013, 2: 71-75 (doi: 10.15389/agrobiol.2013.2.71eng).

30. Барминцева А.Е., Мюге Н.С. Использование микросателлитных локусов для установления видовой принадлежности осетровых и выявления особей гибридного происхождения. *Генетика животных*, 2013, 49: 1093-1105 (doi: 10.7868/S0016675813090038).

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет,
614990 Россия, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
e-mail: lidie.komarova@mail.ru ✉;

Поступила в редакцию
11 января 2018 года

²Пермское отделение ФГБНУ Государственный НИИ озерного и речного рыбного хозяйства,
614002 Россия, г. Пермь, ул. Чернышевского, 3,
e-mail: melnikova_ag@list.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 2, pp. 348-354

GENETIC STRUCTURE OF NATURAL POPULATIONS OF STERLET (*Acipenser ruthenus* L.) IN THE CATCHMENT BASINS OF THE KAMA AND OB RIVERS BASED ON POLYMORPHIC ISSR MARKERS

L.V. Komarova^{1, 2}, N.V. Kostitsyna¹, S.V. Boronnikova¹, A.G. Melnikova²

¹Perm State National Research University, 15, ul. Bukireva, Perm, 614990 Russia, e-mail lidie.komarova@mail.ru (✉ corresponding author);

²State Research Institute of Limnetic and River Fishery, Perm Department, 3, ul. Chernishevskogo, Perm, 614002 Russia, e-mail melnikova_ag@list.ru

ORCID:

Komarova L.V. orcid.org/0000-0002-7021-0017

Boronnikova S.V. orcid.org/0000-0002-5498-8160

Kostitsyna N.V. orcid.org/0000-0002-8681-2135

Melnikova A.G. orcid.org/0000-0003-2717-5188

The authors declare no conflict of interests

Received January 11, 2018

doi: 10.15389/agrobiol.2018.2.348eng

Abstract

Starlet (*Acipenser ruthenus* L.) is included in the Red Data Books of the Russian Federation, Perm Krai and Kirov Province. Inter-microsatellite DNA polymorphism analysis of sterlet populations of the Kama and Ob rivers has not been performed until now. This paper reports on genetic diversity and genetic structure of five natural sterlet populations of the Kama, Ob and Vyatka rivers based on polymorphism of ISSR-PCR markers. The study was carried out in 2015-2016. DNA was extracted from fragments of pectoral fins of fishes aged 3 to 4 years. DNA samples from 195 individuals were analyzed with five effective ISSR primers. POPGENE 1.31 and GenAlEx6 software was used for statistical processing. Basic genetic parameters were proportion (P_{95}) of polymorphic loci, expected (H_e) heterozygosity, number of alleles per locus (N_a), effective number of alleles per loci (N_e), and number of rare alleles (R). The Bayesian method of population structure analysis was performed using STRUCTURE 2.3.4 software. Genetic structure of a population was characterized by proportion of heterozygous genotypes (H_T) in the entire population, the expected proportion of heterozygous genotypes (H_S) in the subpopulation, and the proportion of interpopulation genetic diversity (G_{ST}). As a result, a total of 128 ISSR-PCR markers were identified. The number of amplified ISSR-PCR markers ranged from 7 to 23 depending on the ISSR primer. It was found that the portion of polymorphic loci in *A. ruthenus* populations was high and amounted to 0,938. Genetic diversity was the highest in the Vyatka sterlet population ($P_{95} = 0.876$; $H_e = 0.232$; $N_e = 1.402$; $R = 10$) and the lowest in the Ob sterlet population ($P_{95} = 0.634$; $H_e = 0.100$; $N_e = 1.175$; $R = 3$). A total of 23 rare ISSR-PCR markers were identified for all the samples studied, and 10 of these markers were characteristic of the Vyatka river sterlets. This indicates the possibility of successful identification of these sterlets by population-specific markers. Genetic structure analysis showed that the expected proportion of heterozygous genotypes (H_T) for the total sample was 0.283, whereas H_S index was much lower making 0.173, therefore, G_{ST} value was high and amounted to 0.386. The studied populations were highly differentiated. The interpopulation component accounted for 38.6 % of genetic diversity, while intrapopulation component was responsible for 61.4 %. In each of the studied populations, the rare ISSR-PCR markers have been determined that can be used for identification of studied populations of this species. Thus, the efficiency of ISSR analysis for the identification of sterlets at population level has been proved. It has been established that polylocus ISSR-PCR markers can be used both for characterizing gene pools and for molecular genetic identification of populations and breeds, including sterlet populations and replacement broodstocks. Recommendations for genetic conservation of the Kama and Ob sterlet populations have been developed. These data should be used to manage replacement broodstocks in sterlet artificial reproduction for further release of the fry in a population with an identical gene pool.

Keywords: genetic diversity, gene pool, genetic structure, ISSR-PCR markers, molecular-genetic identification, *Acipenser ruthenus* L., sterlets.